

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CRIZANE HACKBARTH

ASPECTOS MORFOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DO POLIMORFISMO DO CAULE  
– TRONCO E RAMOS - DA *Araucaria angustifolia* (BERTOL.) KUNTZE

CURITIBA

2018

CRIZANE HACKBARTH

ASPECTOS MORFOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DO POLIMORFISMO DO CAULE  
– TRONCO E RAMOS - DA *Araucaria angustifolia* (BERTOL.) KUNTZE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Agronomia (Produção Vegetal).

Orientador: Prof. Dr. Flávio Zanette

Co-orientadora: Profa. Dra. Patrícia Soffiatti

CURITIBA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR -  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, DOUGLAS ALEX JANKOSKI CRB 9/1167  
COM OS DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

H118a Hackbarth, Crizane  
Aspectos morfológicos e fisiológicos do polimorfismo do caule -  
tronco e ramos da *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze / Crizane  
Hackbarth. - Curitiba, 2018.  
120 f.: il., grafs., tabs.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de  
Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia –  
(Produção Vegetal).  
Orientador: Flávio Zanette  
Co-orientadora: Patrícia Soffiatti  
1. Pinheiro-do-paraná. 2. Fisiologia vegetal. 3. Morfologia  
vegetal. 4. Tropismo. I. Zanette, Flávio. II. Soffiatti, Patrícia. III.  
Título. IV. Universidade Federal do Paraná.

CDU 582.473



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA  
(PRODUÇÃO VEGETAL)

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CRIZANE HACKBARTH** intitulada: **ASPECTOS MORFOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DO POLIMORFISMO DO CAULE - TRONCO E RAMOS DA *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 11 de Maio de 2018.

FLAVIO ZANETTE

Presidente da Banca Examinadora

HUGO PACHECO DE FREITAS FRAGA

Avaliador Externo

VALDECI CONSTANTINO

Avaliador Externo

PATRICIA SOFFIATTI

Avaliador Externo

IVAR WENDLING

Avaliador Externo

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a todos que oraram por mim, que me fizeram persistir, ser mais forte e acreditar em meu potencial.

Gratidão aos meus orientadores, Prof. Dr. Flávio e Prof<sup>a</sup>. Dra. Patrícia, por aceitarem me orientar e eu poder dar continuidade aos meus estudos, pela oportunidade de aprender inúmeras coisas, pelo tempo que dedicaram a mim e nossa pesquisa, por acreditarem no nosso trabalho e perseverarem comigo.

A toda minha família, meus pais e irmã.

Ao tio Dario e tia Lúcia, que me acolheram nos primeiros meses em Curitiba, abrindo as portas de sua casa num gesto de amor e carinho.

Ao meu noivo Allan, pela compreensão nos dias não tão bons... que não mediu esforços para fazer meus sonhos acontecerem e que mesmo distante, se fez presente em minha vida todos os dias.

Aos colaboradores deste trabalho, Prof.<sup>a</sup> Dra. Eny Floh e Ma. Amanda Macedo da USP, por auxiliarem tão maravilhosamente no trabalho de aminoácidos. Ao Dr. Henrique Pessoa, da Embrapa Uva e Vinho, gratidão pela oportunidade de realizar as análises de fitormônios.

Aos meus colegas de pós-graduação: Carol, Carlos, Jéssica Welinski, Marcos, Edwin, Leandro, Lury, obrigada pelo companheirismo e pelo auxílio nos trabalhos, e em especial ao Valdeci, que sempre se mostrou solícito e compartilhou ideias importantes neste trabalho. À Guta, que auxiliou nas análises de anatomia.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fitotecnia da UFPR, em especial ao Prof. Dr. Cícero Deschamps e Lucimara Antunes, aos técnicos Nilson Belém Filho e Roger Raupp, gratidão pelos valiosos ensinamentos e gentileza na prestação de serviços. Aos membros da banca Dr. Hugo P. F. Fraga, Dr. Luiz Antonio Biasi, Dra. Patrícia Soffiatti, Dr. Valdeci Constantino, Dr. Flavio Zanette e Dr. Ivar Wendling, pelas valiosas contribuições na Pré-defesa e Defesa da tese.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos desde o mestrado.

Ao IFSC, especialmente à Magali Regina, Andreia Hoepers e Maria Bertília Oss Giacomelli, pela concessão do afastamento parcial das atividades docentes, para que eu pudesse concluir o doutorado.

Ao Simepar, pelo fornecimento de dados meteorológicos.

*“Nada é mais fatal para o progresso da mente humana do que achar que nossas visões da ciência são definitivas, que nossos triunfos são completos, que não há mistérios na natureza, e que não há mundos novos a conquistar.”*

(Humphry Davy)

## RESUMO

O polimorfismo do caule é uma característica marcante da *Araucaria angustifolia*. Até pouco tempo acreditava-se que esta diferenciação permanente entre tronco, ramo (ramo primário) e grimpá ou sapé (ramo secundário), estava atrelada ao tropismo que estes caules apresentam (ortotropismo e plagiotropismo). Esta característica, que é comum às demais espécies da família Araucariaceae, impossibilita a formação de uma planta com arquitetura típica da espécie, quando são utilizados propágulos do ramo e da grimpá na propagação vegetativa. Os mecanismos fisiológicos que regulam este polimorfismo permanente são desconhecidos, e os trabalhos disponíveis até o momento concentram-se no ortotropismo e plagiotropismo do caule. Contudo, com *A. angustifolia*, os estudos nessa área são escassos. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivos: comparar a morfologia dos ápices caulinares do tronco, ramo e grimpá; quantificar os principais fitormônios presentes em cada um dos ápices caulinares ( $GA_3$ ,  $GA_4$ , AIA, ABA, Z, AS, AJ) de plantas normais (enxertos de tronco) e plantas ortotrópicas e plagiotrópicas enxertadas a partir de propágulos do ramo; caracterizar a composição elementar e a composição de aminoácidos-livres das três classes de caules, relacionando estes conteúdos com o polimorfismo e funcionalidade de cada um. A organização interna dos tecidos dos caules e ápices caulinares é semelhante. O meristema apical caulinar de *A. angustifolia* apresenta organização túnica-corpo, semelhante às angiospermas, e células pluripotentes. Os fitormônios detectados e quantificados nos ápices caulinares foram:  $GA_3$ ,  $GA_4$ , AIA, ABA, AS e AJ. ABA foi identificado em maior quantidade e AIA em menor quantidade, possivelmente devido à época em que o material vegetal foi coletado (início de outono), pois a espécie apresenta mecanismos de repouso vegetativo no outono/inverno. Não há uma relação clara entre o polimorfismo dos caules e o conteúdo hormonal, porém as giberelinas podem ter alguma influência neste processo. Em relação ao tropismo dos ramos, não foi verificada nenhuma relação com o conteúdo hormonal dos ápices. Com relação ao conteúdo elementar do xilema secundário, o tronco apresentou um maior percentual de Ca, elemento relacionado à formação da madeira, e a grimpá maior percentual de Si, elemento que se acumula em órgãos que apresentam maior transpiração, indicando que cada um destes caules tem função específica na planta, o que também fica evidente pela composição dos aminoácidos-livres de cada um. O conteúdo total de aminoácidos-livres foi semelhante entre tronco e ramo, diferindo no perfil de aminoácidos de cada caule. A grimpá apresentou níveis de aminoácidos mais baixos, com predomínio daqueles relacionados à fotossíntese, indicando que este caule tenha função semelhante às folhas, enquanto no tronco predominaram aminoácidos relacionados à estrutura e sustentação da planta. O polimorfismo do caule é possivelmente um fenômeno regulado internamente e de forma individual por cada um dos caules, e não apresenta relação com o tropismo dos mesmos, sendo, portanto, fenômenos distintos e independentes.

Palavras chaves: Aminoácidos-livres. Fitormônios. Morfologia do caule. Tropismo.

## ABSTRACT

Stem dimorphism is a striking feature of *Araucaria angustifolia*. Until recently it was believed that this permanent differentiation between trunk, branches (primary branches) and branchlets (secondary branches) was related to the tropism presented by these stems (orthotropism and plagiotropism). Common to other species of *Araucariaceae*, this feature prevents the use of branches and branchlets in vegetative propagation techniques, since the plants formed from these propagules will not present the typical architecture of *A. angustifolia*. The physiological mechanisms that regulate the permanent dimorphism of stem is unknown, and the few studies available focus in trunks's orthotropism and plagiotropism. In *A. angustifolia*, studies regarding tropism are scarce. Therefore, the present study aims to: describe the anatomy of the stem and apices of trunks, branches and branchlets; characterize the composition of phytohormones in the apex of these stems ( $GA_3$ ,  $GA_4$ , IAA, ABA, Z, SA, JA) of normal plants (trunk grafts) and orthotropic and plagiotropic plants grafted from branch propagules; characterize the composition of free amino acids and the elemental composition of the three stems, relating these contents with the dimorphism and functionality of each one. The detailed methodology of each analysis is described in the following chapters. The internal organization stems and apices tissues are similar. The apical meristem of *A. angustifolia* shows a tunica-body organization, similar to angiosperms, and is composed of pluripotent cells. The phytohormones detected and quantified were:  $GA_3$ ,  $GA_4$ , IAA, ABA, SA and JA. The contents of ABA detected were larger while IAA contents were smaller, possibly due to the time of the year when samplings were carried out (early autumn). This corroborates the fact that the species presents a period of dormancy in autumn/winter. There is not a clear relation between the stem's dimorphism and hormonal contents, but gibberellins may have some influence in this phenomenon. Regarding the stem's tropism, no relation was verified with the hormonal content of the apical buds. The trunk had a higher percentage of Ca, an element related to the formation of wood. On the other hand, branchlets presented a greater percentage of Si, an element that accumulates in organs that have a higher transpiration. These results indicate that each of these stems has a specific function in the plant, which also is evident by the amino acid composition. The total content of free amino acids was similar between trunk and branch, differing in the amino acid profile of each stem. Branchlets presented lower levels of amino acids, with a predominance of amino acids related to photosynthesis, indicating that this stem has a similar function to leaves. In the trunk predominated amino acids related to the support of plant. The stem's dimorphism in *A. angustifolia* is possibly a phenomenon regulated internally by each of the stems, by their own distinct mechanisms and is not related to their tropism, being, therefore, distinct and independent phenomena.

Key words: Free amino acid. Phytohormones. Stem's morphology. Tropism.



## LISTA DE FIGURAS

### 2 REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 01.	ÁREA ORIGINAL DE OCORRÊNCIA DE <i>Araucaria angustifolia</i> NO BRASIL (A) E ESTIMATIVA DA ÁREA ATUAL DE OCORRÊNCIA DA ESPÉCIE (B).....	21
FIGURA 02.	MODELOS ARQUITETÔNICOS SEGUNDO HALLÉ, OLDEMAN E TOMLINSON (1978). MODELOS SEM RAMIFICAÇÃO (A). MODELOS COM RAMIFICAÇÃO, SEM DIFERENCIAÇÃO ENTRE OS EIXOS (B). MODELOS COM DIFERENCIAÇÃO ENTRE OS EIXOS (C). MODELOS COM EIXOS MISTOS, FORMANDO TRONCO E RAMO. MODELO DE RAUH CARACTERIZA A ARQUITETURA DE <i>A. angustifolia</i> (DESTACADO EM VERMELHO).....	24
FIGURA 03	PLANTA ENXERTADA COM PROPÁGULOS DE ESTACA DE GRIMPA E CRESCIMENTO PLAGIOTRÓPICO (A). PLANTA ENXERTADA COM PROPÁGULO DE RAMO E CRESCIMENTO ORTOTRÓPICO (B). PLANTA ENXERTADA COM PROPÁGULOS DE ESTACA DE GRIMPA, COM RAMIFICAÇÕES ORGANIZADAS EM VERTICILLOS E CRESCIMENTO PLAGIOTRÓPICO (C).....	25

### 3 CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E COMPOSIÇÃO HORMONAL DOS ÁPICES CAULINARES DO TRONCO E RAMOS DA *Araucaria angustifolia*

FIGURA 01.	PLANTA DE <i>A. angustifolia</i> COM 03 ANOS DE IDADE, ENXERTADA COM PROPÁGULOS RETIRADOS DO TRONCO, QUE SE DESENVOLVEU E FORMOU UMA NOVA PLANTA COM A ARQUITETURA TÍPICA DA ESPÉCIE – MODELO DE RAUH – DA QUAL FORAM RETIRADAS OS ÁPICES DO TRONCO, RAMO E GRIMPA (EXPERIMENTO 01) (A). PLANTAS DE <i>A. angustifolia</i> COM 06 ANOS DE IDADE, COM CRESCIMENTO ORTOTRÓPICO E PLAGIOTRÓPICO - ENXERTADAS A PARTIR DE PROPÁGULOS RETIRADOS DO RAMO - QUE SE DESENVOLVERAM COM A MORFOLOGIA TÍPICA DE UM RAMO (EXPERIMENTO 02) (B).....	43
FIGURA 02.	MORFOLOGIA EXTERNA DOS ÁPICES DO TRONCO (A), RAMO (B) E GRIMPA (C) DA <i>A. angustifolia</i> . SECÇÕES LONGITUDINAIS DA MORFOLOGIA INTERNA DOS ÁPICES DO TRONCO (D), RAMO (E) E GRIMPA (F) OBTIDAS POR MEIO DE TÉCNICAS DE MICROSCOPIA DE LUZ. C = CORPO, ma = MERISTEMA APICAL, mf = MERISTEMA FUNDAMENTAL, pc = PROCÂMBIO, pf = PRIMÓRDIOS FOLIARES, T = TÚNICA. PODEMOS NOTAR A PRESENÇA DE CANAIS RESINÍFEROS PRÓXIMOS À BASE DOS PRIMÓRDIOS FOLIARES, INDICADOS POR SETAS VERDES (E-F). MAC DO TRONCO (J), RAMO (K) E GRIMPA (L) EM FORMATO DE DOMO. AS CÉLULAS APRESENTAM NÚCLEOS GRANDES (n) E DIVERSOS PEQUENOS VACÚOLOS DISPERSOS AO REDOR DO NÚCLEO (v). NA TÚNICA (T) PREDOMINAM AS DIVISÕES ANTICLINAIS (SETAS DUPLAS).....	47
FIGURA 03.	FOTOMICROGRAFIAS (MEV) DOS ÁPICES CAULINARES EM SECÇÕES LONGITUDINAIS DO TRONCO (A), RAMO (B) E GRIMPA (C) DA <i>A. angustifolia</i> , MOSTRANDO PRIMÓRDIOS FOLIARES (pf) E EVIDENCIANDO O FORMATO DE DOMO DO. AMILOPLASTOS FORAM IDENTIFICADOS ATRAVÉS DO TESTE COM LUGOL (D) E TAMBÉM PODEM SER OBSERVADOS NAS IMAGENS FEITAS POR MEV (E) (FOTOMICROGRAFIAS DO ÁPICE DO RAMO), PRINCIPALMENTE NA REGIÃO ABAIXO DO CORPO, NO MERISTEMA FUNDAMENTAL (mf). NA REGIÃO DO PROCÂMBIO OBSERVAM-SE TRAQUEÍDES DIFERENCIADAS (SETA AMARELA). CANAIS RESINÍFEROS ESTÃO PRESENTES AO LONGO DOS ÁPICES CAULINARES, NA BASE DOS PRIMÓRDIOS FOLIARES (SETA VERMELHA) (F).....	49

FIGURA 04.	CONTEÚDO DE GA <sub>3</sub> , GA <sub>4</sub> , ABA, AS E AIA LIVRE (ng g <sup>-1</sup> de MF) DOS ÁPICES CAULINARES DO TRONCO, RAMO E GRIMPA DE PLANTAS DE <i>A. angustifolia</i> ENXERTADAS A PARTIR DE PROPÁGULOS RETIRADOS DO TRONCO (EXPERIMENTO 01). NO GRÁFICO É POSSÍVEL IDENTIFICAR A MEDIANA (LINHA QUE SECCIONA OS RETÂNGULOS – SEGUNDO QUARTIL), OS QUARTIS MÍNIMOS E MÁXIMOS (PRIMEIRO E TERCEIRO QUARTIL) E A AMPLITUDE MÍNIMA E MÁXIMA DOS DADOS (BARRA COM LIMITE INFERIOR E SUPERIOR). NESTES GRÁFICOS É POSSÍVEL IDENTIFICAR A SIMETRIA E/OU ASSIMETRIA DOS DADOS E <i>OUTLIERS</i> INDICADOS EM PONTOS PRETOS.....	51
FIGURA 05.	TEMPERATURA MÉDIA SEMANAL REGISTRADA NO PERÍODO DE JANEIRO/2017 A ABRIL/2017, NA ESTAÇÃO METEOROLÓGICA DO SIMEPAR EM PINHAIS/PR .....	52
FIGURA 06.	CONTEÚDO DE GA <sub>3</sub> , GA <sub>4</sub> , ABA, AS E AIA LIVRE (ng g <sup>-1</sup> de MF) DE ÁPICES CAULINARES DO RAMO E GRIMPA DE PLANTAS ORTOTRÓPICAS E PLAGIOTRÓPICAS DE <i>A. angustifolia</i> ENXERTADAS A PARTIR DE PROPÁGULOS RETIRADOS DO RAMO (EXPERIMENTO 02). NO GRÁFICO É POSSÍVEL IDENTIFICAR A MEDIANA (LINHA QUE SECCIONA OS RETÂNGULOS – SEGUNDO QUARTIL), OS QUARTIS MÍNIMOS E MÁXIMOS (PRIMEIRO E TERCEIRO QUARTIL) E A AMPLITUDE MÍNIMA E MÁXIMA DOS DADOS (BARRA COM LIMITE INFERIOR E SUPERIOR). NESTES GRÁFICOS É POSSÍVEL IDENTIFICAR A SIMETRIA E/OU ASSIMETRIA DOS DADOS E <i>OUTLIERS</i> (PONTOS PRETOS).....	58

#### 4 CAPÍTULO II: MICROANÁLISE ELEMENTAR DO XILEMA SECUNDÁRIO DO CAULE DA *Araucaria angustifolia*

FIGURA 01.	SECÇÕES TRANSVERSAIS DO TRONCO (A-C), RAMO (D-E) E GRIMPA (F-G) DE <i>A. angustifolia</i> . AS IMAGENS FORAM OBTIDAS EM MICROSCOPIA DE LUZ (A-F) E MEV (G-I). CANAIS RESINÍFEROS (SETAS VERMELHAS) ESTÃO PRESENTES NO CÓRTEX. NOTA-SE NO XILEMA SECUNDÁRIO (X) A PRESENÇA DE ANÉIS DE CRESCIMENTO, DEMARCADOS POR TRAQUEÍDES COM PAREDES MAIS ESPESSAS NO LENHO TARDIO E RAIOS UNISSERIADOS (R). PONTOAÇÕES AREOLADAS DAS TRAQUEÍDES (G). SECÇÃO RADIAL MOSTRANDO OS RAIOS (H). LOCAIS (PONTOS BRANCOS) EM QUE FORAM OBTIDOS OS ESPECTROS PARA A ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO ELEMENTAR POR EDS (I) .....	72
FIGURA 02.	COMPOSIÇÃO DE SÓDIO E CÁLCIO (%) DO TRONCO, RAMO, E GRIMPA DA <i>A. angustifolia</i> OBTIDA POR EDS. MÉDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA PARA ESTES ELEMENTOS EM RELAÇÃO AOS LOCAIS EM QUE FORAM OBTIDOS OS ESPECTROS NO XILEMA SECUNDÁRIO.....	74

#### 5 CAPÍTULO III: CONTEÚDO DE AMINOÁCIDOS-LIVRES NO TRONCO E RAMOS DE *Araucaria angustifolia*

FIGURA 01.	CONTEÚDO TOTAL DE AMINOÁCIDOS-LIVRES (µg/g de MF) NO TRONCO, RAMO E GRIMPA DE <i>A. angustifolia</i> COM DOIS ANOS DE IDADE (A); CONTEÚDO DE ASPARTATO (ASP), ÁCIDO γ-AMINO BUTÍRICO + TIROSINA (GABA+TIR), GLUTAMATO (GLU), GLUTAMINA (GLN), ASPARAGINA (ASN) E SERINA (SER) NO TRONCO, RAMO E GRIMPA (µg/g de MF) (B); CONTEÚDO DE ALANINA (ALA), VALINA (VAL), TRIPTOFANO (TRP), HISTIDINA (HIS), FENILALANINA (PHE), CITRULINA (CIT) NO TRONCO, RAMO E GRIMPA (µg/g de MF) (C); CONTEÚDO DE ARGININA (ARG), LEUCINA (LEU), ISOLEUCINA (ILE), GLICINA (GLY) E METIONINA (MET) NO TRONCO, RAMO E GRIMPA (µg/g de MF) (D). LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ENTRE OS CAULES. AS LINHAS VERTICAIS INDICAM O ERRO PADRÃO DAS MÉDIAS (p<0,05).....	87
------------	---	----

## LISTA DE TABELAS

### 3 CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E HORMONAL DOS ÁPICES CAULINARES DO TRONCO E RAMOS DA *Araucaria angustifolia* (ARAUCARIACEAE)

TABELA 01.	COMPARAÇÕES 2X2 ENTRE O CONTEÚDO DE GA <sub>3</sub> , GA <sub>4</sub> , ABA, AS E AIA DOS ÁPICES CAULINARES DO TRONCO, RAMO E GRIMPA DA <i>A. angustifolia</i> (EXPERIMENTO 01), EM QUE O NÍVEL 2 É O NÍVEL DE REFERÊNCIA DO CONTRASTE, RAZÃO DA RESPOSTA É A RAZÃO DE CHANCES DO NÍVEL 1 EM RELAÇÃO AO NÍVEL 2, E O VALOR-P É O VALOR DE P ASSOCIADO A ESTE TESTE.....	53
TABELA 02.	COMPARAÇÕES 2X2 ENTRE O CONTEÚDO DE GA <sub>3</sub> , GA <sub>4</sub> , ABA, AS E AIA DOS ÁPICES CAULINARES DO RAMO E GRIMPA DA <i>A. angustifolia</i> E ENTRE PLANTAS ORTOTRÓPICAS E PLAGIOTRÓPICAS (EXPERIMENTO 02), EM QUE O NÍVEL 2 É O NÍVEL DE REFERÊNCIA DO CONTRASTE, RAZÃO DA RESPOSTA É A RAZÃO DE CHANCES DO NÍVEL 1 EM RELAÇÃO AO NÍVEL 2.....	59

### 4 CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MICROANÁLISE ELEMENTAR DO XILEMA SECUNDÁRIO DO CAULE DA *Araucaria angustifolia*

TABELA 01.	COMPOSIÇÃO ELEMENTAR (%) DE CARBONO (C), OXIGÊNIO (O), SÓDIO (Na), CÁLCIO (Ca), FÓSFORO (P), ENXOFRE (S), POTÁSSIO (K) E SILÍCIO (Si) DO XILEMA SECUNDÁRIO DO TRONCO, RAMO E GRIMPA DA <i>A. angustifolia</i> DETERMINADO ATRAVÉS DE MICROANÁLISE DE RAIO-X POR EDS.....	73
------------	--	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABA	-	Ácido abscísico
ABRAF	-	Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas
AIA	-	Ácido indol-acético
AJ	-	Ácido jasmônico
ALA	-	Alanina
ARG	-	Arginina
AS	-	Ácido salicílico
ASN	-	Asparagina
ASP	-	Aspartato
C	-	Carbono
Ca	-	Cálcio
CIT	-	Citrulina
CK	-	Citocinina
cm	-	Centímetro
CO	-	Centro Organizador
CO <sub>2</sub>	-	Gás Carbônico
DAP	-	Diâmetro a Altura do Peito
EDS	-	Espectroscopia por Dispersão de Energia
Embrapa	-	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
g	-	Grama
g	-	Força G (Força gravitacional)
GA	-	Giberelina
GA <sub>3</sub>	-	Giberelina <sub>3</sub>
GA <sub>4</sub>	-	Giberelina <sub>4</sub>
GABA	-	Ácido γ-aminobutírico
GLC	-	Glicina
GLN	-	Glutamina
GLU	-	Glutamato
h	-	Hora
HIS	-	Histidina
HPLC	-	Cromatografia Líquida de alta eficiência

AIA	-	Ácido indol-3-acético
IUCN	-	International Union for Conservation of Nature and Natural Resources
K	-	Potássio
kg	-	Quilograma
kHz	-	Quilohertz
L	-	Litro
LEI	-	Isoleucina
LEU	-	Leucina
LIS	-	Lisina
LOD	-	Limite de Detecção
LOQ	-	Limite de Quantificação
m	-	Metro
M	-	Molar
MA	-	Meristema axilar
MAC	-	Meristema apical caulinar
MAR	-	Meristema apical radicular
MET	-	Metionina
MEV	-	Microscopia Eletrônica de Varredura
MF	-	Massa fresca
mg	-	Miligrama
min	-	Minuto
mL	-	Mililitro
N	-	Normal
Na	-	Sódio
ng	-	Nanograma
O	-	Oeste
O	-	Oxigênio
ORN	-	Ornitina
P	-	Fósforo
p.	-	Página
PHE	-	Fenilalanina
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
S	-	Sul

S	-	Enxofre
s	-	Segundo
SER	-	Serina
Si	-	Silício
Simepar	-	Sistema Meteorológico do Paraná
TIR	-	Tirosina
TRE	-	Treonina
TRP	-	Triptofano
UFPR	-	Universidade Federal do Paraná
USP	-	Universidade de São Paulo
UPLC	-	Cromatografia líquida de ultra eficiência
V	-	Volts
VAL	-	Valina
Z	-	Zeatina
µg	-	Micrograma
µL	-	Microlitro
°C	-	Graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b><i>Araucaria angustifolia</i> (BERTOL.) KUNTZE: BREVE HISTÓRICO E DESCRIÇÃO.....</b>	<b>20</b>
2.1.1	Características botânicas.....	21
<b>2.2</b>	<b>ARQUITETURA DE PLANTAS E POLIMORFISMO DOS RAMOS EM <i>A. angustifolia</i>.....</b>	<b>23</b>
<b>2.3</b>	<b>MERISTEMA APICAL CAULINAR (MAC) E MERISTEMAS AXILARES (MA).....</b>	<b>28</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E HORMONAL DOS ÁPICES CAULINARES DO TRONCO E RAMOS DA <i>Araucaria angustifolia</i>.....</b>	<b>37</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>37</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
3.2.1	Análise morfológica dos ápices caulinares.....	41
3.2.2	Extração e Quantificação de Fitormônios.....	42
3.2.2.1	Material vegetal e Descrição dos experimentos.....	42
3.2.2.2	Extração dos fitormônios das amostras.....	43
3.2.2.3	Quantificação dos fitormônios.....	44
<b>3.3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
3.3.1	Caracterização morfológica dos ápices caulinares do tronco, ramo e grimpá de <i>A. angustifolia</i> .....	45
3.3.2	Composição de GA <sub>3</sub> , GA <sub>4</sub> , AS, ABA e AIA livre presentes nos ápices caulinares do tronco, ramo e grimpá de <i>A. angustifolia</i> com arquitetura típica segundo modelo de Rauh (Experimento 01).....	50
3.3.3	Composição de GA <sub>3</sub> , GA <sub>4</sub> , AS, ABA e AIA livre presentes nos ápices caulinares do ramo e grimpá de <i>A. angustifolia</i> em plantas ortotrópicas e plagiotrópicas com morfologia de ramo (Experimento 02).....	57
<b>3.4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>
<b>4</b>	<b>MICROANÁLISE ELEMENTAR DO XILEMA SECUNDÁRIO DO CAULE DA <i>Araucaria angustifolia</i>.....</b>	<b>66</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>66</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>67</b>
<b>4.1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>4.2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>69</b>
<b>4.3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>

4.4	CONCLUSÃO.....	76
	REFERÊNCIAS.....	77
5	CONTEÚDO DE AMINOÁCIDOS-LIVRES NO TRONCO E RAMOS DA <i>Araucaria angustifolia</i> .....	80
	RESUMO.....	80
	ABSTRACT.....	81
5.1	INTRODUÇÃO.....	82
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	84
5.3	RESULTADOS.....	86
5.4	DISCUSSÃO.....	88
5.5	CONCLUSÃO.....	94
	REFERÊNCIAS.....	95
	CONCLUSÕES GERAIS.....	99
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101
	REFERÊNCIAS.....	103
	APÊNDICE 01. CURVAS DE DENSIDADE DE KERNEL PARA GA <sub>3</sub> , GA <sub>4</sub> , ABA, AS E AIA DOS ÁPICES DO TRONCO, RAMO E GRIMPA DE <i>A. ANGUSTIFOLIA</i> DO EXPERIMENTO 01(A) E EXPERIMENTO 2 (B). CURVAS PRÓXIMAS UMAS DAS OUTRAS INDICAM QUE OS VALORES FORAM SIMILARES. O FORMATO DA CURVA PARA A MAIORIA DOS FITORMÔNIOS/ÁPICES CAULINARES APRESENTA CAUDA MAIS LONGA, OU SEJA, INDICA UMA DISTRIBUIÇÃO ASSIMÉTRICA DOS DADOS.....	115
	APÊNDICE 02. CROMATOGRAMAS DAS CURVAS-PADRÃO UTILIZADAS PARA O CÁLCULO DOS AMINOÁCIDOS-LIVRES, COM 5 DIFERENTES CONCENTRAÇÕES: 2,5 µg/g (a), 5,0 µg/g (b), 10,0 µg/g (c), 25,0 µg/g (d) and 50,0 µg/g (e).....	116
	APÊNDICE 03. CROMATOGRAMAS DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS-LIVRES DAS AMOSTRAS DO TRONCO (a-g) OBTIDAS DE SETE INDIVÍDUOS DE <i>A. angustifolia</i> COM DOIS ANOS DE IDADE.....	117
	APÊNDICE 04. CROMATOGRAMAS DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS-LIVRES DAS AMOSTRAS DE RAMO OBTIDAS DE SETE INDIVÍDUOS DE <i>A. angustifolia</i> COM DOIS ANOS DE IDADE.....	118
	APÊNDICE 05. CROMATOGRAMAS DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS-LIVRES DAS AMOSTRAS DE GRIMPA OBTIDAS DE SETE INDIVÍDUOS DE <i>A. angustifolia</i> COM DOIS ANOS DE IDADE.....	119
	APÊNDICE 06. ESPELHO DO ARTIGO PUBLICADO (CAPÍTULO 3) NO PERIÓDICO JOURNAL OF FORESTRY RESEARCH, EM DEZEMBRO DE 2017.....	120



## 1 INTRODUÇÃO

A *Araucaria angustifolia* é uma conífera fascinante, de beleza ímpar, com características marcantes e peculiares. A espécie pertence à família Araucariaceae, e juntamente com *A. araucana*, são as únicas representantes da família que são nativas da América do Sul. Enquanto *A. araucana* está distribuída em regiões mais ao oeste do continente, no Chile e Argentina, *A. angustifolia* ocupa áreas do Sul e Sudeste do Brasil, e regiões restritas da Argentina e Paraguai. A exploração da sua madeira, principalmente no século XX, foi de grande valor para a economia dos estados da região Sul do Brasil, repercutindo também no cenário nacional. Sua importância foi tamanha que diversos municípios têm seus nomes oriundos da espécie, como é o caso de Curitiba (do Tupi Guarani: *Ku'ri* = pinheiro, pinhão; *tyba* = muito, aglomerado) e também alguns municípios de sua região metropolitana. Aliás, *A. angustifolia* é conhecida popularmente como pinheiro-do-Paraná, pinheiro-brasileiro, pinheiro-preto, araucária, ou simplesmente pinheiro.

Devido a esta intensa exploração da madeira de *A. angustifolia*, a área de ocupação natural da espécie reduziu drasticamente, para cerca de 2 a 5% da área original (SOUZA et al., 2009). Isto fez com que *A. angustifolia* entrasse para listas de espécies ameaçadas de extinção, e também gerou a criação de diversas leis que impedem o corte da árvore, visando sua conservação. Para suprir a demanda madeireira foram realizados plantios comerciais com *A. angustifolia* a partir de 1966, principalmente devido ao surgimento de incentivos fiscais (DIAS et al., 2017). Segundo a ABRAF (Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas) (2013), a área de florestas plantadas com araucária no Brasil é de 11.343 hectares.

Atualmente, a araucária tem importância econômica pela exploração não somente de sua madeira, mas também pela comercialização de sua semente, o pinhão, que é apreciado em diversos pratos culinários, além de ser um importante alimento para a fauna silvestre. A exploração do pinhão tem importância ainda mais marcante, se levarmos em conta que os principais municípios extratores são de regiões menos desenvolvidas economicamente. Contudo, ao passo que isto representa uma fonte de renda adicional, a coleta do pinhão comercializado é feita quase que exclusivamente de remanescentes nativos que restaram da exploração da *A. angustifolia*, comprometendo a regeneração e conservação da espécie. Torna-

se necessário então, que pomares visando à exploração comercial de pinhão sejam implantados.

A propagação vegetativa de plantas ocorre naturalmente em diversas espécies. Esta é também uma das ferramentas utilizadas, quando realizada de maneira artificial, na implantação de pomares visando à uniformidade, escolha de variedades mais adaptadas às condições locais e precocidade na produção de frutos e sementes. No caso de *A. angustifolia* é importante também para propagar fêmeas, já que a espécie é dioica e são as fêmeas que produzem o pinhão. Dentre as técnicas de propagação vegetativa, a estaquia, a mini-estquia, enxertia e micro-enxertia, já foram pesquisadas em *A. angustifolia*, com destaque para a enxertia, que se mostrou eficiente, de baixo custo e de fácil execução (ANSELMINI; ZANETTE, 2008; ZANETTE; OLIVEIRA; BIASI, 2011; WENDLING; BRONDANI, 2015).

Contudo, o polimorfismo entre tronco, ramo primário<sup>I</sup> e ramo secundário<sup>II</sup> (também conhecido popularmente como grimpas ou sapé), impede que propágulos do ramo e grimpas sejam utilizados. Os propágulos de ramo e grimpas são incapazes de formar uma planta normal, com arquitetura típica, quando propagados vegetativamente. O polimorfismo do sistema caulinar, que é permanente, não importando a técnica ou tratamento impostos, é uma característica comum das plantas da família Araucariaceae.

O tronco apresenta crescimento longitudinal finito, chegando a cinquenta metros de comprimento, ortotrópico, e com crescimento radial ilimitado. Este é capaz de formar tanto brotações ortotrópicas, que originarão ramificações morfogeneticamente idênticas ao tronco (em condições específicas), quanto ramificações plagiotrópicas, com morfogênese de ramo. Os ramos apresentam crescimento plagiotrópico e estão dispostos no tronco em verticilos regulares. Estes ramos apresentam crescimento limitado e na região do crescimento longitudinal, onde são formados os ramos secundários, formam-se as pinhas (estruturas reprodutivas femininas) (ZANETTE et al., 2017).

---

<sup>I</sup> Os ramos primários serão mencionados apenas como ramos neste trabalho.

<sup>II</sup> Os ramos secundários serão mencionados como grimpas.

As grimpas apresentam crescimento limitado e são mais flexíveis. Raramente produzem ginostróbilos, já que poucos indivíduos possuem esta capacidade. Contudo, plantas-macho produzem os androstróbilos neste caule. O tempo de vida é limitado (5-7 anos), sendo que na senescência as grimpas sofrem abscisão, juntamente com as acículas da planta (ZANETTE et al., 2017).

Até pouco tempo acreditava-se que ao reverter-se o tropismo de ramos propagados vegetativamente, estes conseguiriam desenvolver-se morfogenicamente como um tronco. No entanto, apesar do tropismo dos ramos ter sido revertido, não há até o momento estudos que demonstrem a conversão de ramo em tronco, ou vice-versa. O polimorfismo que estes caules apresentam vai além do tropismo ou orientação do crescimento e se estende à função que cada um possui na planta. O tronco apresenta função de sustentação e de ocupação do espaço. Os ramos, e raramente as grimpas, apresentam a função de reprodução na planta. Os fatores internos relacionados ao polimorfismo dos ramos e especificamente ao tropismo são pouco conhecidos e carecem de mais estudos.

Em *A. angustifolia* há poucos trabalhos relacionando aspectos fisiológicos e o tropismo dos ramos. Recentemente, um trabalho constatou que ramos plagiotrópicos apresentaram maior quantidade de ácido indolil-3-acético do que o tronco ortotrópico (GASPAR, 2018). Os poucos estudos existentes com outras espécies relacionam-se aos caules ortotrópicos e sua regulação hormonal, mas sem nenhuma conclusão até o momento. Estes estudos apenas apontam que a auxina e outros fitormônios estariam relacionados ao tropismo, mas que os caules devem ter mecanismos distintos e próprios de regulação do crescimento.

Diante do exposto, a hipótese levantada para o desenvolvimento do presente trabalho é a de que o caule da *A. angustifolia* não forma um sistema único, sendo dividido entre tronco, ramos e grimpas, haja vista as diferenças morfogênicas marcantes que estes caules apresentam entre si, onde cada um desses órgãos apresenta características estruturais e fisiológicas únicas e diferenciadas.

Levando-se em consideração a pronunciada diferença entre os três tipos de caules que ocorrem em *A. angustifolia*, a presente tese teve como objetivos estudar a anatomia dos meristemas apicais; o conteúdo elementar do xilema secundário dos três tipos de caules; qualificar e quantificar os aminoácidos presentes nos caules, bem como os fitormônios, visando comparar a sua estrutura e conteúdo para

entender como essas composições podem estar relacionadas ao comportamento e à função destes órgãos.

No Capítulo I será detalhada a caracterização anatômica dos ápices caulinares do tronco, ramo e grimpá de indivíduos de *A. angustifolia* com aproximadamente dois anos de idade. Neste capítulo também serão apresentados os dados da composição dos principais fitormônios quantificados nos ápices caulinares do tronco, ramo e grimpá de indivíduos com aproximadamente cinco anos de idade, com arquitetura típica de *A. angustifolia*, e a composição dos fitormônios dos ápices de ramos e grimpas de plantas de *A. angustifolia* com morfologia de ramo, ortotrópicas e plagiotrópicas.

No Capítulo II será apresentada a composição elementar do xilema secundário do tronco, ramo e grimpá, de plantas de *A. angustifolia* com dois anos de idade, obtida a partir da técnica de Espectroscopia por Dispersão de Energia (EDS), visando caracterizar a composição elementar do xilema secundário de cada um destes caules, bem como indícios de que os mesmos apresentam funções distintas.

No capítulo III será apresentada a composição de aminoácidos-livres do tronco, ramo e grimpá de *A. angustifolia*, buscando comparar e associar o conteúdo dos aminoácidos-livres destes caules com o polimorfismo e suas funções.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Araucaria angustifolia* (BERTOL.) KUNTZE: BREVE HISTÓRICO E DESCRIÇÃO.

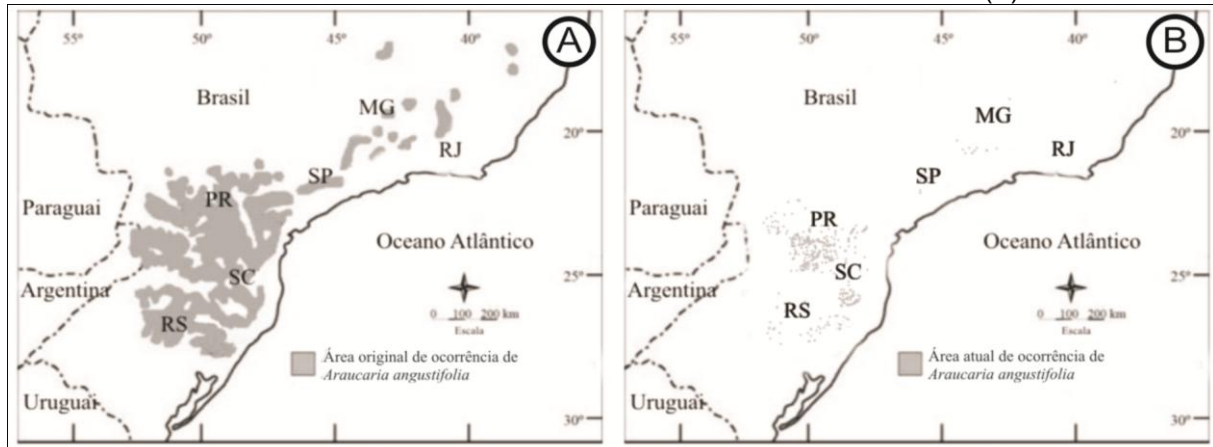
A família Araucariaceae é um dos grupos de coníferas mais interessantes da atualidade. A ocorrência natural da família se dá unicamente no Hemisfério Sul. Contudo, nem sempre foi assim, e a maior diversidade alcançada pela família Araucariaceae ocorreu no período Jurássico e Cretáceo, entre 200 e 65 milhões de anos atrás, tornando-se extinta no Hemisfério Norte no final do período Cretáceo (ZANETTE et al., 2017). Atualmente três gêneros compõem a família: *Agathis*, *Araucaria* e *Wollemia* (EVERT; EICHORN, 2013). *Wollemia* foi descrita em 1994 em um cânion a cerca de 150 km a noroeste de Sidnei, na Austrália, em dois pequenos bosques, com cerca de 40 exemplares, o que torna *Wollemia nobilis* a espécie vegetal mais rara no mundo (EVERT; EICHORN, 2013). Na América do Sul são encontradas apenas duas espécies de Araucariaceae: *Araucaria araucana*, conhecida como araucária-do-Chile na região dos Andes, no Chile e Argentina, e *Araucaria angustifolia*, também conhecida como pinheiro-do-Paraná, pinheiro brasileiro ou simplesmente araucária (ZANETTE et al., 2017).

*A. angustifolia* é uma das espécies madeireiras mais valorizadas na América do Sul (EVERT; EICHORN, 2013), e ocorre naturalmente no Sul do Brasil e em regiões de maior altitude nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, além do nordeste da Argentina, na província de Misiones, e leste do Paraguai (SOUZA et al., 2009; PRACIAK et al., 2013; ZANETTE et al., 2017). No período anterior à colonização, as matas de araucária estenderam-se por 183.900 km<sup>2</sup> no Brasil e nordeste da Argentina (PRACIAK et al., 2013). Contudo, o alto valor madeireiro agregado à espécie, levou a sua intensa exploração, atingindo o auge na década de 1970 (DIAS, et al., 2017).

Hoje em dia, a espécie encontra-se na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção (THOMAS, 2013). Da área original de ocorrência de *A. angustifolia* (FIGURA 1.A), estima-se que restaram cerca de 2 a 5% da população de araucária (FIGURA 1.B), colocando a floresta de araucária como o ecossistema mais devastado do país (ZANETTE et al., 2017). Atualmente, as florestas de araucária

estão restritas a altitudes acima de 600 m, nos três estados mais ao Sul do Brasil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná), entre as latitudes 24 ° e 30 °S (SOUZA et al., 2009).

FIGURA 01. ÁREA ORIGINAL DE OCORRÊNCIA DE *Araucaria angustifolia* NO BRASIL (A) E ESTIMATIVA DA ÁREA ATUAL DE OCORRÊNCIA DA ESPÉCIE (B).



ADAPTADO DE: Souza et al. (2009) e Jo (2012).

De madeira macia, *A. angustifolia* é ideal para ser utilizada na fabricação de papel, carpintaria, construção em geral e fabricação de móveis (PRACIAK et al., 2013). A semente da araucária, também conhecida por pinhão, é uma fonte alimentícia importante para a fauna silvestre e também é consumida pela população local (STEINER et al., 2008). Isto dificulta a regeneração natural da espécie e a recuperação de áreas desmatadas, uma vez que a extração do pinhão para comercialização e consumo se dá a partir dos remanescentes naturais de *A. angustifolia* que restaram de sua intensa exploração. Detalhes mais precisos da regeneração ecológica e da dinâmica florestal da espécie ainda são escassos (PRACIAK et al., 2013).

### 2.1.1 Características botânicas

A espécie foi descrita inicialmente em 1820 por Antonio Bertoloni, como *Columbea angustifolia*, que mais tarde passou a ser denominada de *A. angustifolia*, devido à proximidade filogenética com *A. araucana*. Segundo a classificação botânica, *A. angustifolia* pertence ao reino Plantae, Filo (Divisão) Gymnospermae, Classe Coniferopsida, Ordem Coniferae, família Araucariaceae, Gênero *Araucaria* e

espécie *angustifolia* (ZANETTE et al., 2017). Os primeiros estudos sobre variedades botânicas de *A. angustifolia* foram realizados por Reitz; Klein (1966), que esboçaram a presença de nove variedades: „*elegans*“, „*sancti josephi*“, „*angustifolia*“, „*caiova*“, „*indehiscens*“, '*nigra*', '*striata*', '*semi-alba*' e '*alba*', principalmente com base nas diferenças de coloração e amadurecimento das sementes. No entanto, Mattos (2011) descreveu cinco variedades: „*angustifolia*“, „*indehiscens*“, „*caiova*“, '*dependens*' e '*vinacea*', e uma forma: '*catharinensis*'.

*A. angustifolia* é uma espécie dióica, e suas sementes são dispersas por meio de autocoria e zoocoria (SOUZA et al., 2009). Alguns poucos indivíduos são monóicos e apresentam estróbilos femininos (ginostróbilos) e masculinos (androstróbilos) (REITZ; KLEIN, 1966). Os androstróbilos possuem de 10 a 15 cm de comprimento e 2 a 3 cm de diâmetro. Os ginostróbilos (conhecidos localmente como pinhas) apresentam formato esférico na maturidade, com 20 a 30 cm de diâmetro e 2 a 4 kg (PRACIAK et al., 2013). Contudo, devido à variabilidade genética existente, não são raros os casos de pinhas com até 7 kg.

As sementes são cônicas, com 5 a 7 cm de comprimento, 2 a 2,5 cm de diâmetro, e 5 a 10 g cada uma, possuindo um alto teor de amido. A polinização ocorre pelo vento na primavera, entre setembro e outubro, e atingem a maturação 18 meses após, de abril a junho. Dependendo das condições de polinização, cada pinha pode produzir até 150 sementes férteis e 700 escamas (PRACIAK et al., 2013). As sementes são recalcitrantes e perdem viabilidade quando armazenadas em freezer a -18 °C por 60 dias. Porém quando armazenadas sob refrigeração a 5 °C mantêm-se com boa viabilidade mesmo após 180 dias (GARCIA et al., 2014).

A raiz principal é profunda, com um sistema secundário de raízes mais superficiais. As folhas, também denominadas de acículas, são triangulares e pontiagudas (PRACIAK et al., 2013; ZANETTE et al., 2017). Na maturidade, as árvores alcançam de 30 a 35 m de altura, com DAP de 1 a 1,3 m. O tronco é reto, cilíndrico, com ramos de primeira ordem arranjados em verticilos, com crescimento horizontal (plagiotrópico) de até 10 m de comprimento (HALLÉ, 2010; PRACIAK et al., 2013; ZANETTE et al., 2017). Os ramos secundários, também conhecidos como grimpas ou sapés, apresentam tempo de vida mais curto, de 5-7 anos, com senescência e queda após este período, levando consigo as acículas (ZANETTE et al., 2017).

A *A. angustifolia* tolera sombra e geada, mas apresenta crescimento pleno quando exposta ao sol. Os danos no ápice caulinar, oriundos de ataques de insetos ou danos mecânicos podem originar uma copa com o desenvolvimento de dois troncos principais, em formato de forquilha. A *A. angustifolia* sofre uma abscisão dos ramos primários naturalmente quando presente em agrupamentos florestais, como uma “autopoda”, mas isto é menos frequente quando a planta cresce em ambientes abertos (PRACIAK et al., 2013).

*A. angustifolia*, assim como outras plantas da família Araucariaceae, apresenta duas particularidades morfológicas interessantes que estão relacionadas a aspectos de propagação vegetativa e arquitetura da planta: a presença de pólos meristemáticos nas axilas das acículas, ao invés de gemas completas, e o plagiotropismo pronunciado e permanente de seus ramos (IRITANI, 1997).

## **2.2 ARQUITETURA DE PLANTAS E POLIMORFISMO DOS RAMOS EM *A. angustifolia***

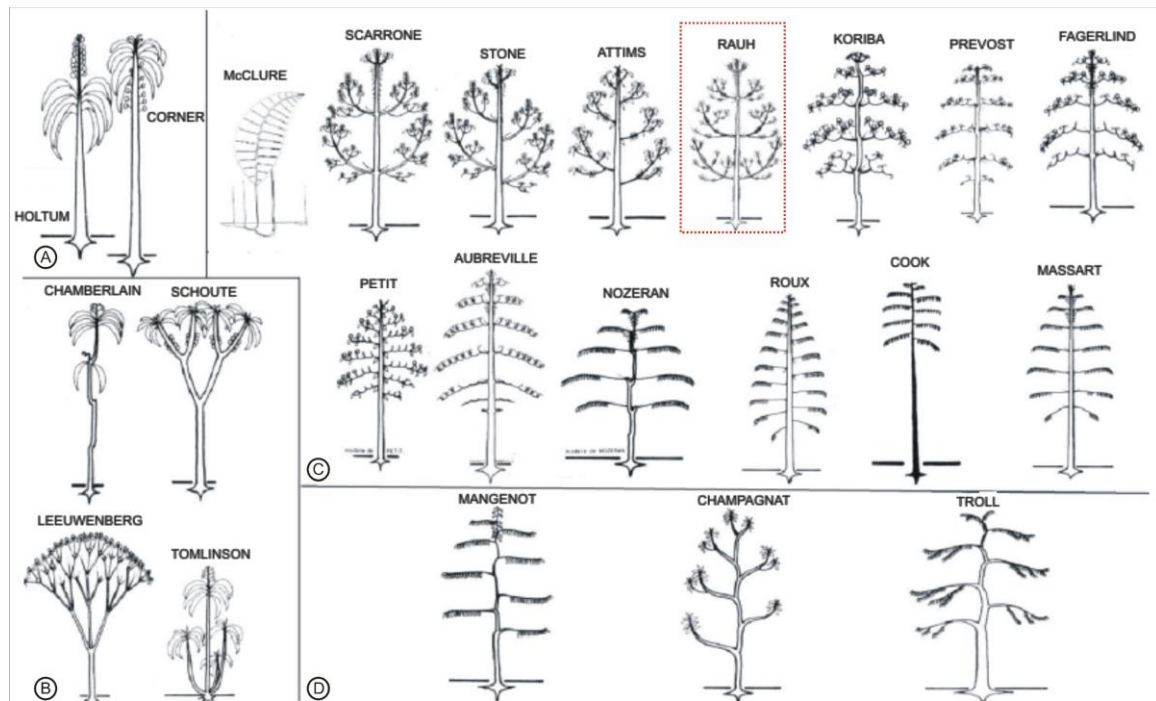
No reino vegetal há uma grande variação de tamanhos e morfologias, mas dentro de cada espécie há restrições de forma e tamanho bem definidas que são modificadas somente até certos limites por condições ambientais (BÖGRE; MAGYAR; LÓPEZ-RUEZ, 2008). A arquitetura de uma planta depende da natureza e disposição relativa de cada uma das suas partes; é, em qualquer momento, a expressão de um equilíbrio entre processos de crescimento endógeno e restrições exógenas exercidas pelo meio ambiente. O objetivo da análise arquitetônica é, por meio da observação e às vezes experimentação, identificar e entender esses processos endógenos e separá-los da plasticidade de sua expressão resultante de influências externas (BARTHÉLÉMY; CARAGLIO, 2007).

Hallé; Oldeman; Tomlinson (1978) desenvolveram um sistema de classificação da arquitetura das árvores baseando-se nas combinações de unidades meristemáticas (eixos ou ramos), que formam o tronco e suas ramificações. Os eixos são classificados em relação à determinação do crescimento (determinado e indeterminado) e tropismo (ortotrópico e plagiotrópico). Os eixos podem derivar de outros eixos nas orientações terminal, contínua, difusa, dicotômica, rítmica, zonal, ou no caso dos eixos do tronco, basal ou abaixo do solo. Baseando-se nestas variáveis



os autores propuseram 22 modelos arquiteturais (HALLÉ, 2010) (FIGURA 02). Desta forma, Hallé (2010) também afirma que para a determinação do modelo arquitetural de uma árvore três pontos-chave são fundamentais: a orientação do crescimento dos eixos (plagiotrópica ou ortotrópica), a disposição da ramificação (contínua ou rítmica) e a distribuição das partes reprodutivas (terminal ou lateral). A combinação destes três pontos-chave permite definir muitos modelos de arquitetura.

FIGURA 02. MODELOS ARQUITETÔNICOS SEGUNDO HALLÉ, OLDEMAN E TOMLINSON (1978). MODELOS SEM RAMIFICAÇÃO (A). MODELOS COM RAMIFICAÇÃO, SEM DIFERENCIAÇÃO ENTRE OS EIXOS (B). MODELOS COM DIFERENCIAÇÃO ENTRE OS EIXOS (C). MODELOS COM EIXOS MISTOS, FORMANDO TRONCO E RAMO. MODELO DE RAUH CARACTERIZA A ARQUITETURA DE *A. angustifolia* (DESTACADO EM VERMELHO).



FONTE: COSTA, 2014.

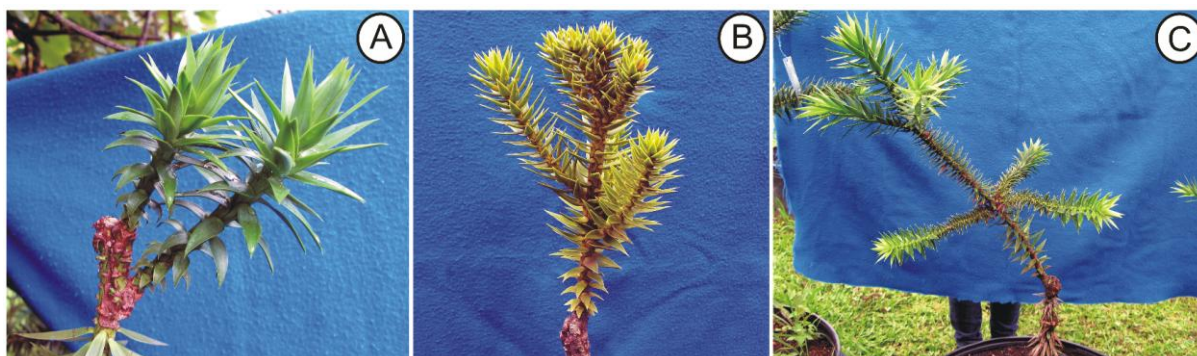
A *A. angustifolia* é uma planta com forte dominância apical. O modelo que melhor define a arquitetura da planta é o estabelecido por Rauh (HALLÉ; OLDEMAN; TOMLINSON, 1978). Este modelo caracteriza-se pela arquitetura formada a partir de um tronco ortotrópico de crescimento indeterminado (monopodial), com crescimento rítmico sobre o qual os ramos têm uma disposição verticilada ou subverticilada. A filotaxia é em espiral e os ramos são plagiotrópicos. Quando jovem, a arquitetura da copa de *A. angustifolia* é semelhante a um cone, com ramos inseridos no tronco desde a sua base, em situações em que não há competição por fatores limitantes do crescimento da planta. Já na fase adulta, a

planta passa a ter um formato de guarda-chuva/candelabro, com diminuição no número de ramos e suas extremidades passam a curvar-se para cima (ZANETTE et al., 2017).

*A. angustifolia* possui o caule com três elementos distintos morfogenicamente: o tronco, os ramos primários e os ramos secundários (grimpas ou sapés) (ZANETTE et al., 2017). O aspecto único de plantas da família *Araucariaceae* (gêneros *Wollemia*, *Araucaria* e *Agathis*) é que o tronco e sua gema são ortotrópicos e os ramos e suas gemas são plagiotrópicos, e assim permanecem independentemente de qualquer orientação ou tratamento que lhes é imposto (HAINES; FOSSARD, 1977). O caule da *A. angustifolia* apresenta este polimorfismo, que se caracteriza pela diferença no hábito de crescimento, apresentando um tronco com crescimento ortotrópico (verticalizado) e os ramos, plagiotrópicos (horizontal/inclinado) (ZANETTE et al., 2017).

Os caules ortotrópicos crescem verticalmente no ápice da árvore ou em brotações laterais do tronco. Os ramos plagiotrópicos apresentam orientação lateral, com crescimento e tempo de vida limitados (PRACIAK et al., 2013). Se utilizados para enxertia ou estaquia, os ramos plagiotrópicos não formam indivíduos normais (FIGURA 03). Esta característica permanece mesmo se a enxertia for realizada sobre um tronco ortotrópico (ZANETTE; OLIVEIRA; BIASI, 2011). Quando a enxertia de propágulos trunciformes é feita sobre ramos primários, a morfologia do tronco e o crescimento ortotrópico também são mantidos (CONSTANTINO, 2017).

FIGURA 03. PLANTA ENXERTADA COM PROPÁGULOS DE ESTACA DE GRIMPA E CRESCIMENTO PLAGIOTRÓPICO (A). PLANTA ENXERTADA COM PROPÁGULO DE RAMO E CRESCIMENTO ORTOTRÓPICO (B). PLANTA ENXERTADA COM PROPÁGULOS DE ESTACA DE GRIMPA, COM RAMIFICAÇÕES ORGANIZADAS EM VERTICILLOS E CRESCIMENTO PLAGIOTRÓPICO (C).



FONTE: Arquivo pessoal de Flávio Zanette.

O desenvolvimento de ramos pode ser separado em vários eventos. O primeiro é a formação de um meristema na axila da folha, o segundo é a formação da gema oriunda deste meristema axilar e o terceiro é a brotação. As gemas podem se desenvolver para formar novos ramos ou permanecerem dormentes ou semi-dormentes (HOLALU, 2014). A iniciação do meristema axilar é influenciada por vários fatores genéticos, enquanto que o crescimento do broto é profundamente influenciado pelas interações complexas decorrentes tanto da regulação do desenvolvimento quanto do meio ambiente (McSTEEN; LEYSER, 2005; LEYSER, 2009).

O mecanismo para a formação de meristemas axilares ortotrópicos ou plagiotrópicos a partir do meristema apical do caule não está esclarecido. Este fenômeno caracteriza-se por uma diferenciação somática que pode ser permanente, e propagar as duas diferentes formas por meio da propagação vegetativa (IRITANI; ZANETTE; CISLINSKY, 1992). Considera-se geralmente que os meristemas axilares são produtos do meristema apical caulinar (MAC). No entanto, este pode não ser o caso dos meristemas axilares de todas as plantas. Em *Arabidopsis* a reversão de uma porção de células diferenciadas para o estado meristemático nas axilas das folhas dá origem a meristemas axilares (LONG; BARTON, 2000).

Nas Araucariaceae, assim como em outras gimnospermas, não há uma gema completa na axila de cada acícula. Os polos meristemáticos que originam os ramos são formados em intervalos regulares a partir do terceiro mês após a germinação. A ramificação plagiotrópica desenvolve-se em verticilos com 4 a 6 ramos em cada verticilo, definindo a arquitetura tipicamente cônica nos indivíduos jovens destas espécies (IRITANI; ZANETTE; CISLINSKY, 1992). Contudo, na axila de todas as outras acículas, um pequeno grupo de células meristemáticas estão presentes, e quando liberadas da dominância da gema apical do tronco, são capazes de se desenvolverem e formarem brotações ortotrópicas, com a morfologia típica do tronco (IRITANI; ZANETTE; CISLINSKY, 1992).

Fica claro então, que na axila das acículas do tronco estão presentes pólos meristemáticos ortotrópicos e plagiotrópicos. Os pólos meristemáticos são capazes de formar tanto um novo tronco, em casos específicos como danos físicos, por exemplo, quanto originar ramos primários plagiotrópicos, num processo natural de formação de sua arquitetura típica. Já nos ramos primários e grimpas, pólos

meristemáticos capazes de gerar um broto ortotrópico com característica típica de tronco parecem estar ausentes ou incapazes de manifestar naturalmente tal característica (IRITANI; ZANETTE; CISLINSKY, 1992).

O crescimento e o desenvolvimento das plantas são regulados de uma maneira complexa via uma extensa rede de sinalização interna e externa. Os sinais internos são substâncias químicas, como os fitormônios e enzimas, que atuam em respostas às flutuações ambientais, embora também estejam sob controle do ritmo circadiano e mecanismos genéticos (TAIZ; ZAIGER, 2009). Compreender o funcionamento dos fitormônios dentro de uma rede integrativa é essencial tanto para estudos básicos quanto aplicados.

O desenvolvimento de ramos plagiotrópicos é um componente importante na arquitetura de diversas árvores, não somente da araucária. Contudo, a maior parte dos estudos envolvendo a ramificação e dominância apical focam em ramos e gemas ortotrópicas (McSTEEN; LEYSER, 2005). O conhecimento sobre plagiotropismo e regulação hormonal é limitado. Em *A. angustifolia* há uma carência de estudos envolvendo o plagiotropismo com regulação hormonal. Além disso, estudos relacionando a composição bioquímica dos três tipos de caule e o polimorfismo que eles apresentam também são escassos.

Segundo Muday (2001), quando um caule naturalmente vertical é recolocado em uma posição horizontal ocorre uma acumulação assimétrica de auxina como resposta ao gravitropismo. No entanto, essa deposição assimétrica de auxina é apenas temporária durante o deslocamento do órgão. Os ramos destinados a serem permanentemente oblíquos devem ter um sistema de regulação diferente do que o controle do tronco ortotrópico (VEIERSKOV et al., 2007). Outros fitormônios, como as citocininas, giberelinas e o ácido abscísico devem estar envolvidos na inclinação dos ramos e no crescimento plagiotrópico (McSTEEN; LEYSER, 2005).

Segundo Wilson (2000) é possível que haja alguma relação entre o conteúdo hormonal e o controle apical observado nas plantas arbóreas, que influencie no plagiotropismo do caule. Porém o mesmo autor levanta a hipótese de que provavelmente não há um mecanismo único para todos os fenômenos envolvidos no controle apical. Os mecanismos são provavelmente diferentes para os processos de crescimento que determinam o tamanho da brotação, o alongamento do caule e atividade cambial.

Na espécie *Abies nordmanniana* o desenvolvimento das gemas em ramos parece estar sob a influência de um sinal derivado do tronco, porém a decapitação do tronco não afetou a orientação dos ramos formados, o que levou os autores a concluir que o fenômeno do plagiotropismo é provavelmente regulado dentro do próprio ramo (VEIERSKOV et al., 2007).

### 2.3 MERISTEMA APICAL CAULINAR (MAC) E MERISTEMAS AXILARES (MA)

O eixo apical-basal de uma planta é estabelecido durante a embriogênese, e nas extremidades apicais estão presentes os meristemas primários que constituirão o caule/folhas/flores e a raiz das plantas. Na axila de cada folha estão presentes meristemas axilares (MA), que formarão folhas e ramos e caracterizarão a morfologia da planta (TEICHMANN; MUHR, 2015). A arquitetura das plantas é determinada pelo número e pela atividade dos meristemas axilares e pela característica dos ramos desenvolvidos a partir destas gemas (TEICHMANN; MUHR, 2015).

As plantas apresentam crescimento aberto ou indeterminado, caracterizado pela capacidade de geração de novos órgãos e tecidos de maneira recorrente durante a vida (VERNOUX; BENFEY, 2005). A capacidade de crescer e se desenvolver de forma modular, no qual o número de órgãos não é pré-definido, possibilita aos vegetais uma maior plasticidade morfológica e fisiológica em resposta às variações ambientais (DINNENY; BENFEY, 2008). A flexibilidade no desenvolvimento pós-embrionário das plantas é proporcionada por pequenos grupos celulares, denominadas de “*stem cells*” ou células meristemáticas (RODRIGUES; KERBAUY, 2009).

As células meristemáticas estão localizadas nos meristemas, que são tecidos proliferativos presentes em regiões específicas do corpo vegetal em crescimento (BEVERIDGE et al., 2007). Estas células possuem a habilidade de se dividir e manter seu próprio grupo de células indiferenciadas, ao mesmo tempo em que proporcionam a formação de células derivadas, que se diferenciam e formam novos tecidos e órgãos (DINNENY; BENFEY, 2008). O termo meristema foi proposto por Carl Wilhem Von Nageli em seu livro *Beiträge zur Wissenschaftlichen Botanik*, publicado em 1958, para designar o conjunto de células responsáveis pela origem

dos órgãos vegetais, distinguindo as células apicais e as células componentes do câmbio (SCOFIELD; MURRAY, 2006).

Os estudos dos meristemas realizados nos últimos anos introduziram novas terminologias e conceitos que ainda geram dúvidas. Isto se deve ao fato de que houve uma rápida divulgação destes resultados, nas mais diversas áreas da pesquisa biológica, sem uma uniformização prévia dos termos e interpretações (RODRIGUES; KERBAUY, 2009). Dentre os novos termos propostos, a denominação células-tronco para as células dos meristemas gera muita polêmica. O termo foi inicialmente proposto para algumas células animais, mas se estendeu também para alguns tipos celulares localizados nas plantas (VERDEIL et al., 2007). Nos meristemas também há discordância sobre quais tipos de células deveriam receber a denominação de células meristemáticas (RODRIGUES; KERBAUY, 2009).

Durante a embriogênese zigótica são estabelecidos dois meristemas primários em pólos opostos no embrião: meristema apical caulinar (MAC) e meristema apical radicular (MAR) (STAHL; SIMON, 2005). Além destes, há outros meristemas de origem pós-embrionária, tais como meristemas axilares do caule e meristemas formadores de raízes laterais (SCOFIELD; MURRAY, 2006). A arquitetura do sistema caulinar das plantas é determinada pela atividade das células iniciais estruturais e das iniciais justapostas a elas, que são originadas da atividade mitótica destas células, contidas no MAC (WANG; LI, 2008).

As células presentes nos meristemas apicais operam um balanço dinâmico entre a proliferação e a diferenciação das células recém produzidas para a incorporação em órgãos. Isto é controlado por um padrão hormonal e um programa específico de expressão gênica (BEVERIDGE et al., 2007). Assim, o destino dessas células é influenciado pela localização delas no meristema, no qual a divisão das células iniciais leva ao afastamento das células-filhas para a periferia, podendo então se diferenciar e se juntar a outras células para iniciar um novo órgão (BEVERIDGE et al., 2007).

As funções essenciais das células iniciais dependem do posicionamento destas em uma região altamente regulada por sinais endógenos. Portanto, estas células adquirem ou expressam as características típicas não por possuírem propriedades celulares específicas pré-existentes, mas sim porque se encontram em um microambiente que as definem (JIANG; FELDMAN, 2005). Na região onde as

células iniciais estão localizadas nos meristemas ocorre um sistema complexo e bem integrado de sinalização intercelular, que é necessário para a manutenção deste grupo de células (TUCKER; LAUX, 2007).

As regiões periféricas dos meristemas apicais envolvidas na formação de órgãos coincidem com locais de acúmulo de auxina, a qual é transportada de forma controlada e direcionada por uma família de proteínas chamadas PINFORMED (PIN) (REINHARDT et al., 2003). Desta forma, a auxina é considerada um sinal desencadeador na morfogênese das plantas, pois determina a localização na qual as células adquirirão a identidade de iniciadoras de órgãos (DRUBOVSKY et al., 2008).

Para evitar uma super-proliferação de células iniciais nos meristemas, e desta forma prejuízos no desenvolvimento vegetal, são necessários mecanismos regulatórios, nos quais se destacam programas genéticos e fatores ambientais (BÖGRE; MAGYAR; LÓPEZ-RUEZ, 2008). Os hormônios vegetais desempenham importantes funções neste processo, especialmente as auxinas na especificação meristemática e organogênese, e as citocininas no controle da diferenciação celular (HEISLER et al., 2005). Os principais participantes da sequência de expressão gênica, bem como suas inter-relações nas vias de sinalização, foram descritos na planta-modelo *Arabidopsis thaliana* (SHANI; YANAI; ORI, 2006).

O MAC é organizado em camadas e zonas celulares. Em *A. thaliana* há uma região mais superficial caracterizada pela organização das células em três camadas sobrepostas denominadas de L1, L2 e L3 (do inglês *Layer 1*, *Layer 2* e *Layer 3*), e na região mais interna do meristema destaca-se um grupo pequeno de células formadoras da zona central do MAC (RODRIGUES; KERBAUY, 2009). As camadas L1 e L2 geram a epiderme e a subepiderme dos caules, folhas e flores, e a camada L3 origina os tecidos internos dos órgãos aéreos. Entre a camada L3 e a zona central encontra-se o centro organizador (CO) do MAC. As células do CO juntamente com as suas iniciais imediatas formam o nicho das células iniciais que se auto-perpetuam por taxas baixas de divisões mitóticas (WANG; LI, 2008).

As células meristemáticas têm sido consideradas de natureza pluripotente, quando contextualizadas no corpo do vegetal, pois, apesar de possuírem a capacidade de originar os diferentes tipos celulares responsáveis pela formação dos tecidos e órgãos, elas não apresentam a capacidade de formar um organismo

completo (embrião) quando mantidas *in situ* (VERDEIL et al., 2007). O grau de plasticidade das células vegetais foi adotado a partir das definições já feitas para as células animais, e compõe-se da seguinte classificação: células unipotentes (originam apenas um tipo específico de célula ou tecido), células multipotentes (originam mais de um tipo de célula no corpo do organismo), células pluripotentes (possuem a habilidade de originar a maior parte dos diferentes tipos celulares que compõe um organismo) e células totipotentes (originam todos os tipos celulares que formam o corpo do organismo) (VERDEIL et al., 2007).

A totipotencialidade das células vegetais também está relacionada às condições de cultivo *in vitro*, envolvendo a desdiferenciação celular, no qual são alterados os perfis de transcrição e de tradução pré-existentes, permitindo o estabelecimento de um novo programa de desenvolvimento (ATTA et al., 2009). As células meristemáticas pluripotentes das plantas são isodiamétricas com um núcleo esférico com um ou mais nucléolos e citoplasma denso. As células pluripotentes apresentam uma elevada proporção núcleo/citoplasma e citoplasma altamente vacuolado (YEUNG, 1995).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos visando caracterizar e compreender os meristemas em plantas, principalmente os mecanismos genéticos e fisiológicos. Contudo, grande parte desses estudos foram realizados com *A. thaliana* ou outras angiospermas, enquanto em gimnospermas há poucos estudos (ROGGE-RENNER et al., 2013). A organização do ápice caulinar nas diferentes gimnospermas mostra um certo grau de especialização. O ápice caulinar das gimnospermas, tem por característica apresentar em sua superfície, divisões tanto periclinais quanto anticlinais (GOVIL, 2007).

Em Araucariaceae, a camada superficial do ápice caulinar é bem estabelecida como uma túnica, e as divisões periclinais são raras (GOVIL, 2007). Esta região representa a zona de iniciação de todo ápice caulinar e é distinta da região composta pelas células iniciais, também chamada de meristema superficial. Estas células caracterizam-se pelo tamanho grande, vacúolos grandes, e a presença de parede celular fina (GOVIL, 2007; ROGGE-RENNER et al., 2013). Nos lados desta camada, assim como abaixo da zona central das células iniciais, outras regiões do ápice caulinar desenvolvem-se como resultado das divisões horizontais e diagonais das células iniciais, compondo a zona periférica (eumeristema) e a zona



medular (meristema fundamental) (GOVIL, 2007). Em algumas gimnospermas a zona cambial (procâmbio) também é distinta. Em *Araucaria comlunaris* e *Agathis alba* há duas camadas de células compondo a túnica, enquanto que em *Araucaria bidwilli* e *Agathis palmerstomei* a túnica é composta por uma camada. Abaixo da túnica há um grupo de células iniciais que constituem o corpo do domo meristemático, que se dividem em todos os planos e contribuem com a formação do restante do caule (GOVIL, 2007).

A composição e organização morfológica do meristema apical caulinar e radicular da *A. angustifolia* foi descrito mais recentemente em embriões zigóticos no estágio cotiledonar (ROGGE-RENNER et al., 2013). As células meristemáticas do MAC e MAR apresentam estrutura geral e organização ultraestrutural, incluindo forma isodiamétrica, com núcleos grandes, um ou dois nucléolos e muitos amiloplastos, semelhante às angiospermas. Assim como é observado nas células de angiospermas, as células do meristema da *A. angustifolia* exibem características pluripotentes, tais como aparatos para comunicação intercelular e diferenciação (ROGGE-RENNER et al., 2013). As células do MAC de embriões zigóticos de *A. angustifolia* apresentam parede celular primária fina, interconectadas por plasmodesmas. Análises histoquímicas indicam a presença de polissacarídeos ácidos e neutros na parede celular. Estas células apresentam poucos grãos de amido (ROGGE-RENNER et al., 2013).

## REFERÊNCIAS

- ANSELMINI, J. I.; ZANETTE, F. Microenxertia e sua caracterização morfológica em *Araucaria angustifolia*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 967-973, 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000400010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS (ABRAF). **Anuário estatístico da ABRAF 2013 ano base 2012**. Brasília, DF, 2013. 146 p. Disponível em: <<https://goo.gl/1k4JnR>> Acesso em: 21/03/2018.
- ATTA, R.; LAURENS, L.; BOUCHERON-DEBUISSON, E.; GUIVARCH, A.; CARNERO, E.; GIRAUDAT-PATOT, V.; RECH, P.; CHIRQUI, D. Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyls explants grown *in vitro*. **The Plant Journal**, v. 57, n. 4, p. 626-644, 2009. doi: 10.1111/j.1365-3113.2008.03715.x.
- BARTHÉLÉMY, D.; CARAGLIO, Y. Plant architecture: a dynamic, multilevel and comprehensive approach to plant form, structure and ontogeny. **Annals of Botany**, v. 99, n. 3, p. 375-407, 2007. doi: 10.1093/aob/mcl260.
- BEVERIDGE, C. A.; MATHESIU, U.; ROSE, R. J.; GRESSHOFF, P. M. Common regulatory themes in meristem development and whole-plant homeostasis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, n. 1, p. 44-51, 2007. doi: 10.1016/j.pbi.2006.11.011.
- BÖGRE, L.; MAGYAR, Z.; LÓPEZ-JUEZ, E. New clues to organ size control in plants. **Genome Biology**, v. 9, n. 7, p. 1-7 (226), 2008. doi: 10.1186/gb-2008-9-7-226.
- CONSTANTINO, V. **Nutrição de mudas e morfogênese da *Araucaria angustifolia*. (BERT.) O. Ktze. submetida à enxertia**. 133 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal - Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017. Disponível em: <<https://goo.gl/tRNf12>> Acesso em: 15/02/2018.
- COSTA, M. P. **Arquitetura e alometria de espécies arbóreas em uma floresta estacional subtropical**. 67 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014. Disponível em: <<https://goo.gl/A5YTkq>> Acesso em: 02/05/2018.
- DIAS, A. C. C.; MARCHESAN, R.; PIERONI, G. B.; ALMEIDA, V.C.; VIEIRA, R. S.; MORAES, C.B. Qualidade da Madeira para produção de lâminas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Floresta**, v. 47, n. 3, p. 333-341, 2017. doi: 10.5380/ufv.47i1.50732.
- DINNENY, J. R.; BENFEY, P. N. Plant stem cell niches: standing the test of time. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 553-557, 2008. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.001.
- EVERT, R. F.; EICHORN, S. E. **Raven Biology of Plants**. New York: W.H. Freeman and Company, 8 ed., 2013, 900 p.

GARCIA, C.; COELHO, C. M. M.; MARASCHIN, M.; OLIVEIRA, L. M. Conservação da viabilidade e vigor de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze durante o armazenamento. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 4, p. 857-867, 2014. doi: 10.1590/1980-509820142404006.

GASPAR, R. G. B. **Enxertia de copa e predição de hábitos de crescimento em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze**. 80 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018. Disponível em: <<https://goo.gl/RH2oBk>> Acesso em: 16/05/2018.

GOVIL, C. M. **Gymnosperms extinct and extant**. Delhi: Krishna Prakashan Media Ltda, 1 ed., 332 p., 2007.

HEISLER, M. G.; OHNO, C.; DAS, P.; SIEBER, G.; REDDY, G. V.; LONG, J. A.; MEYEROWITZ, E. M. Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. **Current Biology**, v. 15, n. 21, p. 1899-1911, 2005. doi: 10.1016/j.cub.2005.09.052.

HOLALU, S. V. **Phytochrome B controls shoot architecture by regulating phytochrome interacting factors and phytohormones**. 94 f. Thesys (Graduate and Professional Studies of Texas A&M University) Texas A&M University, Texas, 2014. Disponível em: <https://goo.gl/cn8XWY> Acesso em: 19/01/2018.

IRITANI, C. **Aspectos múltiplos da cultura 'in vitro' da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze**. 1997. 222 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997. Disponível em: <<https://goo.gl/5z6LNZ>> Acesso em: 16/03/2018.

IRITANI, C.; ZANETTI, F.; CISLINSKY, J. Aspectos anatômicos da cultura in vitro de *Araucaria angustifolia*. I. Organização e desenvolvimento dos meristemas axilares ortotrópicos de segmentos caulinares. **Acta Biológica Paranaense**, v. 21, n. 1,2,3,4, p. 57-76, 1992. doi: 10.5380/abpr.v21i0.741.

JIANG, K.; FELDMANN, L. J. Regulation of root apical meristem development. **Annual Review of Cell Developmental Biology**, v. 21, p. 485-509, 2005. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.122303.114753.

JO, L. **Estabelecimento de marcadores bioquímicos para embriogênese somática em *Araucaria angustifolia***. 2012. 117 f. (Dissertação). São Paulo, SP, Universidade de São Paulo, 2012, 117 p. Disponível em: <https://goo.gl/Chx8LS> Acesso em: 21/03/2018.

LEYSER, H. M. O. The control of shoot branching: an example of plant information processing. **Plant Cell & Environment**, n. 32, p. 694-703, 2009. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.01930.x.

LONG, J.; BARTON, M. K. Initiation of axillary and floral meristems in *Arabidopsis*. **Developmental Biology**, n. 218, p. 341-353, 2000. doi: 10.1006/dbio.1999.9572.

MATTOS, J. R. **O pinheiro Brasileiro**. Florianópolis, SC: Editora UFSC, 2011, 698 p.

McSTEEN, P.; LEYSER, O. Shoot branching. **Annual Review Plant Biology**, n. 56, p. 353-374, 2005. doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144122.

PRACIAK, A.; PASIECZNIK, N.; SHEIL, D.; VAN HEIST, M.; SASSEN, M.; CORREIA, C. S.; DIXON, C.; FYSON, G.; RUSHFORD, K.; TEELING, C. (eds). **The CABI encyclopedia of forest trees**. Oxfordshire: CABI, 2013, 531 p.

REINHARDT, D.; PESCE, E. R.; STIEGER, P.; MANDEL, T.; BALTENSPERGER, K.; BENNET, M.; TRAAS, J.; FRIML, J.; KUHLEMEIER, C. Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. **Nature**, v. 426, n. 6964, p. 255-260. doi 10.1038/nature02081.

REITZ, R.; KLEIN, R. M. Araucariáceas. In R. REITZ (Ed.), **Flora ilustrada Catarinense**. Itajaí, SC: Herbário Barbosa Rodrigues, 1966, 62 p.

RODRIGUES, M. A.; KERBAUY, G. B. Meristemas: fontes de juventude e plasticidade no desenvolvimento vegetal. **Hoehnea**, v. 36, n. 4, p. 525-550, 2009. doi: 10.1590/S2236-89062009000400001.

ROGGE-RENNER, G. D.; STEINER, N.; SCHMIDT, E. C. et al. Structural and component characterization of meristem cells in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze zygotic embryo. **Protoplasma**, v. 250, n. 3, p. 731-739, 2013. doi: 10.1007/s00709-012-0457-8.

SCOFIELD, S.; MURRAY, J. A. H. The evolving concept of the meristem. **Plant Molecular Biology**, v. 60, n. 6, p. V-VII, 2006. doi: 10.1007/s11103-006-0061-4.

SHANI, E.; YANAI, O.; ORI, N. The role of hormones in shoot apical meristems. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 5, p. 484-489, 2006. doi: 10.1016/j.pbi.2006.07.008.

SOUZA, M. I. F.; SALGUEIRO, F.; CARNAVALE-BOTTINO, M.; FÉLIX, D. B.; ALVES-FERREIRA, M.; BITTENCOURT, J. V. M.; MARGIS, R. Patterns of genetic diversity in southern and southeastern *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze relict populations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 3, p. 546-556, 2009. doi: 10.1590/S1415-47572009005000052.

STAHL, Y.; SIMON, R. Plant stem cells niches. **International Journal of Developmental Biology**, v. 49, n. 5/6, p. 479-489, 2005. doi: 10.1387/ijdb.041929ys.

STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; ANDRADE, J. B. R.; BALBUENA, T. S.; GUERRA, M. P.; HANDRO, W.; FLOH, E. I. S.; SILVEIRA, V. *Araucaria angustifolia* biotechnology. **Functional Plant Science Biotechnology**, v. 2, p. 20-28, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 4. ed. 2009, 848 p.

TEICHMANN, T.; MUHR, M. Shaping plant architecture. **Frontiers in Plant Science**, v. 6 (233), p. 1-18, 2015. doi: 10.3389/fpls.2015.00233.

THOMAS, P. *Araucaria angustifolia*. **The IUCN Red List of Threatened Species** **2013**: e.T32975A2829141. doi: 10.2305/IUCN.UK.2013-RLTS.T32975A2829141.en.

TUCKER, M. R.; LAUX, T. Connecting the paths in plant stem cell regulation. **Trends in Cell Biology**, v. 17, n. 8, p. 403-410, 2007. doi: 10.1016/j.tcb.2007.06.002.

VERDEIL, J. L.; AEMANNO, L.; NIEMENAK, N.; TRANBARGER, T. J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 6, p. 245-252, 2007. doi: 10.1016/j.tplants.2007.04.002.

VERNOUX, T.; BENFEY, P. N. Signals that regulate stem cell activity during plant development. **Current opinion in Genetics & Development**, v. 15, n. 4, p. 388-394, 2005. doi: 10.1016/j.gde.2005.06.008.

WANG, Y.; LI, J. Molecular basis of plant architecture. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 253-279, 2008. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092902.

WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. Resgate vegetativo e estaquia de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze. **Revista Floresta**, v. 39, n. 1, p. 93-104, 2015. doi: 10.1590/0100-67622015000100009.

WILSON, B. F. Apical control of branch growth and angle in woody plants. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 5, p. 601-607, 2000. doi: 10.2307/2656846.

YEUNG, E. C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Kluwer Academic, Netherlands, p. 205-247, 1995.

ZANETTE, F.; DANNER, M. A.; CONSTANTINO, V.; WENDLING, I. Particularidades e biologia reprodutiva de *Araucaria angustifolia*. In: WENDLING, I.; ZANETTE, F. (eds) **Araucária: particularidades, propagação e manejo de plantios**. Embrapa, Brasília, p.15-39, 2017.

ZANETTE, F.; OLIVEIRA, L. S.; BIASI, L. A. Grafting of *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze through de four seasons of the year. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 4, p. 1364-1370, 2011. doi: 10.1590/S0100-29452011000400040.

### 3 CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E HORMONAL DOS ÁPICES CAULINARES DO TRONCO E RAMOS DA *Araucaria angustifolia*

#### RESUMO

*Araucaria angustifolia* apresenta um polimorfismo permanente entre tronco, ramo e grimpá. Apesar de ser uma característica marcante em *A. angustifolia*, os mecanismos fisiológicos de regulação do polimorfismo no seu sistema caulinar permanecem desconhecidos, e atualmente está atrelado ao tropismo que estes caules apresentam. Este trabalho teve por objetivo caracterizar a morfologia interna dos ápices caulinares do tronco, ramo e grimpá de *A. angustifolia* e dos fitormônios presentes nos ápices caulinares, buscando elucidar alguns mecanismos fisiológicos de regulação do polimorfismo dos ramos e do tropismo. Foram retirados ápices caulinares de plantas enxertadas a partir de propágulos do tronco, com arquitetura típica de *A. angustifolia*, e de propágulos de ramo com diferentes tropismos (ortotrópicos e plagiotrópicos). A análise anatômica dos ápices caulinares foi realizada com técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Os meristemas dos três caules apresentam formato de domo, exibem células isodiamétricas e pluripotentes, com núcleos grandes e vários vacúolos pequenos; apresentam organização túnica-corpo, semelhante ao observado em angiospermas, sem diferenças anatômicas evidentes entre os caules. A quantificação dos fitormônios foi determinada por UPLC, sendo quantificados GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, AS, ABA e AIA. Foram observadas diferenças no conteúdo de fitormônios entre ao menos um par de ápices, exceto para AIA. ABA apresentou-se em maior quantidade em todos os ápices (entre 1518,3 e 4148,4 ng g<sup>-1</sup> de MF), e o AIA em menores quantidades (entre 2,44 e 7,09 ng g<sup>-1</sup> de MF), em níveis próximos ao limite de detecção, possivelmente devido à época de coleta do material vegetal (início de outono). Dentre os fitormônios analisados, as giberelinas podem ter relação com o polimorfismo dos caules. O conteúdo de GA<sub>3</sub> pode estar relacionado ao dimorfismo dos ramos e grimpas e GA<sub>4</sub> pode estar mais relacionado ao dimorfismo do tronco. Fica evidente que *A. angustifolia* apresenta mecanismos de repouso vegetativo durante o outono/inverno. Em relação ao tropismo, não houve diferença significativa entre o conteúdo de fitormônios de plantas ortotrópicas e plantas plagiotrópicas. O tropismo das plantas não teve influência sobre a composição hormonal dos ápices, sendo considerado, portanto, um processo distinto ao polimorfismo.

Palavras-chave: Mecanismos fisiológicos. Meristema Apical Caulinar. Ortotropismo. Polimorfismo do caule. Plagiotropismo.

### 3 CHAPTER I: ANATOMICAL AND PHYTOHORMONAL CHARACTERISTICS OF THE SHOOT APICES OF TRUNK AND BRANCHES OF *Araucaria angustifolia*

#### ABSTRACT

*Araucaria angustifolia* presents a permanent polymorphism between trunk, branches and branchlets. Although it is a striking feature in *A. angustifolia*, the physiological mechanisms of polymorphism regulation in the stem system remains unknown, and is currently linked to the tropism of each one. The aim of this study is to characterize the internal morphology of the trunk, branch and branchlet apices of *A. angustifolia* and to analyze the composition of phytohormones present in them, seeking to elucidate some physiological mechanisms of regulation of the stem's dimorphism and tropism. Stem apices of plants grafted from trunk propagules with typical *A. angustifolia* architecture and from branch propagules with different tropisms (orthotropic and plagiotropic). Sampling was carried out in April 2017 in plants with 03-06 years of grafting. For the anatomical characterization samples of stems's apices were embedded in Historesin according to manufacturer's instructions and sectioned following usual techniques. The anatomical analysis of the stem apices was performed using light microscopy and scanning electron microscopy techniques. The meristems of the three stems apices are domed, characterized by isodiametric and pluripotent cells, with large nuclei and several small vacuoles; they show the tunica-body organization, similar to observed in angiosperms, with no evident morphological difference between the stems. The phytohormones' composition was determined by UPLC and the following hormones were quantified: GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, SA, ABA and IAA. Statistical analysis were performed using boxplot graphs and Likelihood Ratio Test at 5% significance. Differences were observed in the content of phytohormones between at least one pair of buds, except for IAA. ABA was present in high quantities in all apices (among 1518.3 and 4148.4 ng g<sup>-1</sup> of FW), and the IAA in low quantities (among 2.44 and 7.09 ng g<sup>-1</sup> of FW), at levels close to the limit of detection, possibly due to the collection time of the vegetal material (beginning of autumn, dormancy period). GA<sub>3</sub> contents might be related to branches and branchlets dimorphism and GA<sub>4</sub> might be more related to the trunk dimorphism. Regarding tropism, there was no significant difference between the content of phytohormones of orthotropic and plagiotropic plants. It is evident that *A. angustifolia* presents bud dormancy mechanisms during autumn/winter. The tropism had no influence on the hormonal composition of the apices, being considered, therefore, a distinct process to the polymorphism.

Key-words: Stem's Dimorphism. Physiological mechanisms. Shoot apical meristem. Orthotropism. Plagiotropism.

### 3.1 INTRODUÇÃO

*Araucaria angustifolia* é uma conífera perene e dioica, nativa da América do Sul (ZANETTE et al., 2017). A intensa exploração de sua madeira culminou num drástico declínio da população na área de ocorrência natural da espécie, levando *A. angustifolia* à lista da IUCN como "criticamente ameaçada" de extinção (THOMAS, 2013). Muitos esforços têm sido realizados para propagar e conservar essa espécie. No entanto, as estratégias convencionais são dificultadas principalmente pela natureza recalcitrante das sementes (SHIBATA et al., 2016) e pelo polimorfismo permanente do caule (ZANETTE; OLIVEIRA; BIASI, 2011; CONSTANTINO, 2017; ZANETTE et al., 2017).

O polimorfismo do sistema caulinar é um fenômeno que se estende a todas as plantas da família Araucariaceae, além de outras espécies, como por exemplo, *Abies nordmanniana* (VEIERSKOV et al., 2007). Esta característica restringe a utilização de propágulos do ramo e grimpas na propagação vegetativa, pois o polimorfismo é mantido e impede a formação de uma nova planta com a arquitetura típica de *A. angustifolia* (CONSTANTINO, 2017; ZANETTE et al., 2017).

A arquitetura de *A. angustifolia* segue o modelo de Rauh (HALLÉ; OLDEMAN; TOMLINSON, 1978; KOEHLER, 2009). O tronco é cilíndrico, com crescimento pronunciado e ortotrópico, no qual os ramos de primeira ordem estão organizados em pseudo-verticilos, com crescimento plagiotrópico. Os ramos (de primeira ordem), por sua vez, emitem de maneira alternada ramos de segunda ordem, conhecidos por grimpas ou sapés, com crescimento anatrópico e tempo de vida limitado de 5-7 anos (ZANETTE et al., 2017).

A arquitetura das plantas é determinada pelo número e pela atividade dos meristemas apicais e axilares e pela característica dos ramos desenvolvidos a partir das gemas axilares (TEICHMANN; MUHR, 2015). Os ramos laterais desenvolvem-se a partir de gemas axilares formadas na base das folhas. Essas gemas, que compreendem um meristema, e alguns primórdios foliares, podem ficar quiescentes ou podem ser ativadas para formar ramificações. A dinâmica destas gemas é estimulada ou não por vários fatores ambientais e de desenvolvimento, como a dominância apical de outro ramo em desenvolvimento na planta (GONZÁLEZ-



GRANDIO et al., 2017), que são refletidos por meio de sinais endógenos, como fatores de transcrição e fitormônios.

Na *A. angustifolia*, assim como outras araucariáceas, são encontrados pólos meristemáticos nas axilas das acículas. Estes são formados em intervalos regulares a partir do terceiro mês após a germinação, desenvolvendo-se em verticilos com ramos plagiotrópicos, que formam a arquitetura tipicamente cônica nos indivíduos jovens destas espécies (IRITANI; ZANETTE; CISLINSKY, 1992). Os mecanismos que levam *A. angustifolia* a formar tanto os ramos plagiotrópicos quanto ortotrópicos são desconhecidos.

Apesar dos ramos plagiotrópicos serem componentes importantes na arquitetura de diversas árvores, o conhecimento científico a cerca deste processo e sua regulação hormonal é limitado (VEIERSKOV et al., 2007; RASMUSSEN et al., 2010). Estudos que envolvem ramificação, controle e dominância apical focam em ramos e brotações ortotrópicas (McSTEEN; LEYSER 2005). Diversos fitormônios, como auxinas, citocininas, giberelinas e ácido abscísico podem estar envolvidos na inclinação do ramo e no crescimento plagiotrópico (ALONI et al., 2004; LaMOTTE; PICKARD, 2004; RASMUSSEN et al., 2010). É importante ressaltar que a distinção entre o tronco, ramo e grimpá de *A. angustifolia* vai além da inclinação ou tropismo.

Em *A. angustifolia*, enxertos de ramos com crescimento ortotrópico já foram obtidos, contudo eles mantiveram a morfologia de ramo (CONSTANTINO, 2017). Além da ausência de estudos referentes à composição de fitormônios dos ápices caulinares, também há carência de estudos que tratem da anatomia dos meristemas apicais caulinares do tronco, ramo e grimpá, que são os formadores destes caules. Recentemente, GAPAR (2018) avaliou a concentração de auxina em acículas de tronco e ramo de *A. angustifolia* com diferentes idades, e constatou que os ramos apresentaram maior quantidade de auxina, principalmente em indivíduos mais velhos.

Este trabalho teve como objetivos: caracterizar a anatomia dos ápices caulinares do tronco, ramo e grimpá da *A. angustifolia*; qualificar e quantificar os fitormônios presentes no ápice caulinar do tronco, ramo e grimpá de plantas jovens de *A. angustifolia* (arquitetura típica da planta); qualificar e quantificar os fitormônios do ápice caulinar do ramo e grimpá de plantas ortotrópicas e plagiotrópicas (arquitetura atípica de *A. angustifolia*), propagadas a partir de ramos.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Análise morfológica dos ápices caulinares

As plantas de *A. angustifolia* utilizadas neste experimento foram provenientes de mudas de sementes e foram cultivadas no Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em Curitiba – PR (25°25" de latitude Sul e 49°16" de longitude Oeste, com altitude média de 934,6 m), em vasos de 20 L, em condições homogêneas de cultivo. Foram coletados os ápices caulinares do tronco, ramo e grimpá, no último verticilo formado partindo do topo da planta, de cinco indivíduos com aproximadamente dois anos de idade. Com esta idade, as plantas já apresentam uma morfologia definitiva. Acículas e primórdios foliares mais externos foram removidos sob microscópio estereoscópio.

As análises anatômicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia e Biomecânica Vegetal (LABV) do Departamento de Botânica da UFPR, em Curitiba/PR. As amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato de potássio 0,1 M e pH 7,2 (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964) por 48 h. Posteriormente as amostras foram lavadas no mesmo tampão por três vezes e desidratadas em série etílica crescente (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 95%-3x), infiltradas em hidróxi-metil-metacrilato (Leica Historesina<sup>®</sup>) e emblocadas nesta mesma resina, conforme recomenda o fabricante. Secções longitudinais de 6-7 µm de espessura foram obtidas com auxílio de micrótomo de rotação Leica<sup>®</sup> RM 2145.

O material foi tratado com solução de azul de toluidina 0,05% e montado entre lâmina e lamínula com verniz vitral. Algumas secções dos ápices caulinares do tronco, ramo e grimpá foram tratadas com lugol para evidenciar os grãos de amido. As imagens microscópicas foram realizadas em microscópio óptico Olympus BX-41 com câmara digital Olympus DC030 acoplada.

Para a obtenção de fotomicrografias por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), as amostras foram fixadas e desidratadas conforme descrito anteriormente. Os ápices caulinares foram divididos longitudinalmente e após a desidratação foi realizado o ponto crítico com CO<sub>2</sub> líquido. Em seguida, as amostras foram montadas em suportes (*stubs*) de alumínio recoberto com fita dupla-face de

cobre e foram metalizadas em ouro. As fotomicrografias foram realizadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Vega3 LM, Tescan). As imagens foram obtidas com voltagem acelerada de 15 kV em baixo vácuo. Os procedimentos foram realizados no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

### 3.2.2 Extração e Quantificação de Fitormônios

#### 3.2.2.1 Material vegetal e descrição dos experimentos

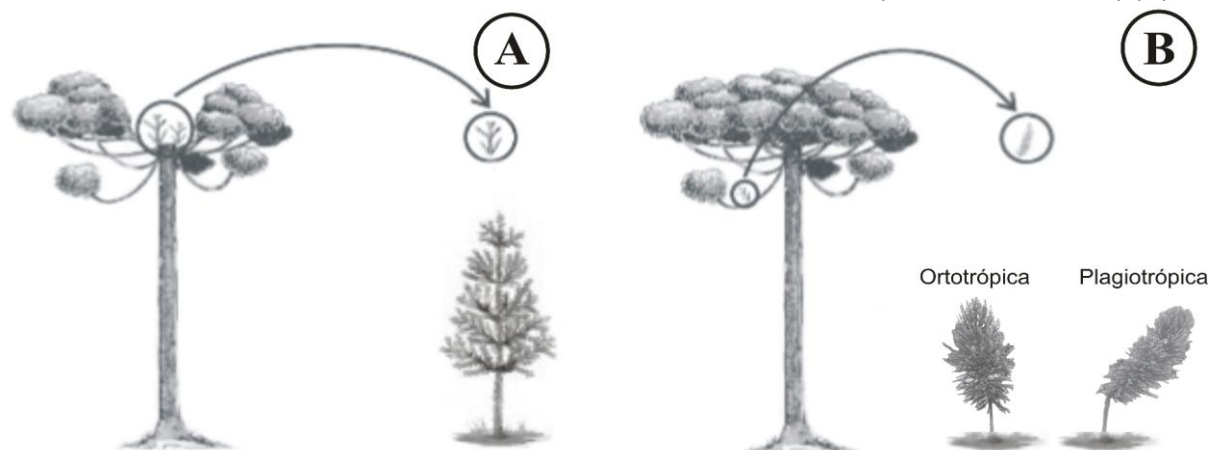
A caracterização da composição dos fitormônios nos ápices caulinares de plantas de *A. angustifolia* enxertadas foi realizada a partir da execução de dois experimentos. As plantas utilizadas nos ensaios foram cultivadas na Fazenda Experimental Canguiri da UFPR, localizada no município de Pinhais/PR (25°23'12"S e 49°07'33"O), sob condições homogêneas. O clima do município, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Cfb – subtropical úmido mesotérmico, isto é, clima caracterizado como temperado úmido com temperatura média do mês mais quente acima de 10 °C, com verões suaves e inverno com geadas frequentes e tendência de concentração de chuva nos meses de verão, contudo sem estação seca definida.

No Experimento 01 foi avaliada a composição de fitormônios dos ápices caulinares do tronco, ramos e grimpas de plantas de *A. angustifolia* enxertadas a partir de propágulos retirados do tronco sobre porta-enxerto de origem seminal (FIGURA 1.A). O material vegetal utilizado para a quantificação dos fitormônios foi coletado após aproximadamente três anos da realização da enxertia, em sete indivíduos. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, e para a extração e quantificação dos fitormônios as amostras foram trituradas e homogeneizadas, sendo retiradas seis repetições para a análise.

No Experimento 02 foi avaliada a composição de fitormônios dos ápices caulinares dos ramos e das grimpas de plantas enxertadas de *A. angustifolia* a partir de segmentos caulinares de ramos, apenas, sobre porta-enxertos produzidos a partir de sementes. As plantas foram separadas de acordo com a orientação do crescimento dos enxertos: ortotrópica ou plagiotrópica (FIGURA 1.B). O experimento foi conduzido em esquema fatorial 2x2 e delineamento inteiramente casualizado,

sendo que um fator foi a orientação do crescimento das plantas (plagiotrópica ou ortotrópica) e o outro fator foi o local da coleta dos ápices caulinares na planta (gema terminal do ramo ou das grimpas). O material vegetal utilizado para a quantificação dos fitormônios foi coletado após aproximadamente seis anos da realização da enxertia, em sete indivíduos. Para a extração e quantificação dos fitormônios, as amostras foram previamente trituradas e homogeneizadas, sendo retiradas seis repetições para a análise.

FIGURA 01. PLANTA DE *A. angustifolia* COM 03 ANOS DE IDADE, ENXERTADA COM PROPÁGULOS RETIRADOS DO TRONCO, QUE SE DESENVOLVEU E FORMOU UMA NOVA PLANTA COM A ARQUITETURA TÍPICA DA ESPÉCIE – MODELO DE RAUH – DA QUAL FORAM RETIRADAS OS ÁPICES DO TRONCO, RAMO E GRIMPA (EXPERIMENTO 01) (A). PLANTAS DE *A. angustifolia* COM 06 ANOS DE IDADE, COM CRESCIMENTO ORTOTRÓPICO E PLAGIOTRÓPICO - ENXERTADAS A PARTIR DE PROPÁGULOS RETIRADOS DO RAMO - QUE SE DESENVOLVERAM COM A MORFOLOGIA TÍPICA DE UM RAMO (EXPERIMENTO 02) (B).



FONTE: Adaptado de WENDLING; STUEPP; ZUFFELLATO-RIBAS, 2016.

O material vegetal foi coletado no mês de abril de 2017, e foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e transportado sob refrigeração ao laboratório para posterior análise. A extração e análise da composição hormonal foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Uva e Vinho, em Bento Gonçalves/RS.

### 3.2.2.2 Extração dos fitormônios das amostras

A extração dos fitormônios das amostras e a análise foram realizadas de acordo com um protocolo adaptado de Müller; Munné-Bosch (2011) e Dobrev; Vankova (2012). Para a extração dos fitormônios, os ápices intactos foram triturados

em criomoínho (SPEX 6870 SamplePrep Co., USA) com nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino, e as amostras foram mantidas a -20 °C até o uso. Em cada amostra de 500 mg foi adicionado 4 mL de solução de extração (metanol:água:ácido fórmico, 75:20:5, v/v) contendo 2 mM de ácido cítrico. O metanol e o ácido fórmico utilizados foram da Sigma-Aldrich, USA, enquanto a água Milli-Q foi obtida em equipamento no laboratório (MerckMillipore, EUA).

As amostras foram incubadas a -20 °C durante 3 h e depois transferidas para um sonicador (Soniclean 2PS, Sanders, Brasil) com frequência de 40 kHz durante 25 minutos a 4 °C, seguido por uma centrifugação de 1750 xg durante 30 min a 4 °C (Micro 17TR, Hanil Science Industrial, Coréia do Sul). O sobrenadante foi coletado e armazenado e as amostras foram re-extraídas duas vezes com 3 mL de solução de extração cada vez e sonicadas conforme descrito anteriormente. Além disso, as amostras foram mantidas durante 6 h (segunda extração) e 12 h (terceira extração) a -20 °C antes da sonicação. Após o último passo de centrifugação, os sobrenadantes foram combinados, secos em um concentrador a vácuo até o volume aproximado de 0,2 mL e purificados em cartuchos SPE Oasis MCX.

Em duas amostras extras de cada tratamento foi adicionado 100 ng mL<sup>-1</sup> de uma solução padrão de fitormônios com concentração conhecida para determinar a eficiência de recuperação e o efeito da matriz no processo de extração. A recuperação e o efeito da matriz foram determinados comparando-se as áreas de pico do padrão analítico antes e depois da extração.

O sobrenadante proveniente da extração foi ressuspenso em 2 mL de ácido fórmico 1 M em água. As amostras ressuspendidas foram aplicadas no cartucho SPE Oasis MCX. O cartucho SPE Oasis MCX foi lavado com 5 mL de metanol seguido de condicionamento com 5 mL de metanol:água:ácido acético (10:89:1, v/v). Posteriormente, foram aplicadas as amostras ressuspendidas e o cartucho foi lavado com 3 mL de ácido fórmico 1 M e eluído com 5 mL de metanol (Eluente 1), seguido de 5 mL de hidróxido de amônio a 5% em metanol (Eluente 2). Após, as amostras foram novamente secas, conforme descrito anteriormente (Item 3.2.2.2), até o volume final de aproximadamente 0,2 mL.

### 3.2.2.3 Quantificação dos fitormônios.

Nesta etapa, as soluções padrão foram utilizadas como referências nos ajustes cromatográficos e de detecção. A quantificação foi realizada em uma bomba quaternária do sistema UPLC™ da Acquity (Waters Co., EUA), equipada com um amostrador automático, ligada em um sistema de espectrômetro de massa tripla (MS/MS) quadrupolar Waters Xevo™, equipado com uma interface ESI. Uma coluna UPLC BEH C18 (Waters, EUA) (2.1 × 50 mm, 1,7 µm) foi usada. A fase móvel na separação cromatográfica consistiu em uma mistura binária de eluente A (0,05% de ácido acético glacial em água) e eluente B (0,05% de ácido acético glacial em acetonitrila). O gradiente em B consistiu de 1% a 100% em 2,2 min, e foi mantido em 100% até 2,8 min na taxa de fluxo de 0,3 mL min<sup>-1</sup>, com temperatura da coluna de 40 °C. O volume de injeção de 5 µL foi aplicado em todas as análises. As análises de (GA<sub>3</sub>), Giberelina<sub>4</sub> (GA<sub>4</sub>), ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético livre (AIA livre) e ácido salicílico (SA) foram realizadas em ionização negativa (ESI<sup>-</sup>).

As porções sólidas medidas com precisão dos padrões ABA, AS, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, e AIA (Sigma-Aldrich) foram dissolvidas em metanol para preparar 1 mg mL<sup>-1</sup> de solução de reserva. As soluções de trabalho foram preparadas a partir de soluções de estoque com diluição em série em metanol imediatamente antes da utilização. A curva padrão, com a sequência de concentração de 5, 10, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 e 3200 ng L<sup>-1</sup>, foi preparada em três diluições independentes em metanol com análise/quantificação em LCMS/MS em triplicata. O software Target Lynx™ (Waters, EUA) foi utilizado para quantificação, com limite de detecção (LOD) maior do que 3 e o limite de quantificação (LOQ) superior a 10.

Os dados foram apresentados por meio de gráficos *boxplots*, de pontos e de densidade para os tratamentos em relação às variáveis respostas. A análise estatística foi realizada por meio do ajuste de um modelo linear generalizado com distribuição Gamma (NETER et al. 1996). A seleção de variáveis foi realizada através do Teste da Razão de Verossimilhanças com nível de significância de 5% (CASELLA; BERGER, 2002). A análise foi desenvolvida pelo software R.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Caracterização anatômica dos ápices caulinares do tronco, ramo e grimpia de *A. angustifolia*

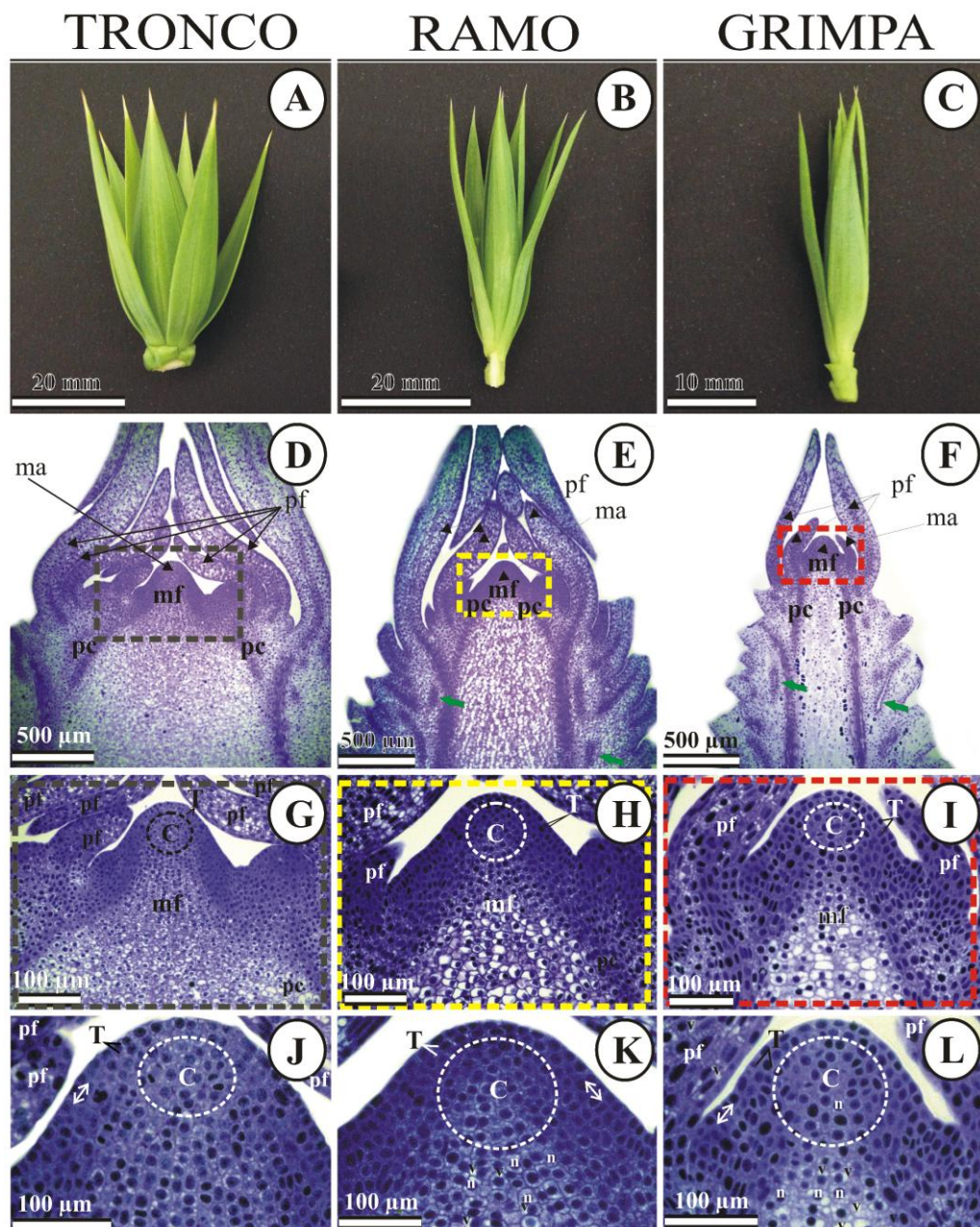
Na FIGURA 02.A-C temos uma visão geral externa do ápice do tronco, ramo e grimpia da *A. angustifolia*, visão interna ampla destes ápices (FIGURA 02.D-I) e uma visão aproximada do MAC destes três caules (FIGURA 02.J-L).

Em secção longitudinal, o MAC dos três tipos de caule de *A. angustifolia* possui formato de domo (FIGURA 02). O MAC é constituído por duas camadas de túnica (L1 e L2) e um agrupamento de células compactas que formam o corpo (L3) (FIGURA 02.G-L). O MAC pode ser subdividido em uma zona central que consiste em três camadas de células distintas (L1-L3) e o CO subjacente, uma zona periférica circundante de células que se dividem mais rapidamente e se diferenciam para formar órgãos laterais e uma zona subjacente (*rib meristem* ou meristema em fileiras) que adiciona células ao tronco em crescimento. As camadas L1 e L2 consistem em células que se dividem predominantemente em sentido anticlinal, e formam os tecidos epidérmicos e subepidérmicos, respectivamente, e as células da camada L3 se dividem em todas as direções para dar origem aos tecidos internos (HEISDRA; SABATINI, 2014).

Dentre as gimnospermas, a família Araucariaceae apresenta a túnica e o corpo como uma característica de suas espécies, o que não é comum para outras gimnospermas. O número de camadas que compõem a túnica varia entre as espécies. Em *Araucaria comlunaris* e *Agathis alba* há duas camadas de células compondo a túnica, enquanto que em *Araucaria bidwilli* e *Agathis palmerstomei* a túnica é composta por uma camada (GOVIL, 2007). Esta organização em camadas é muito semelhante ao observado em eudicotiledôneas (CARLES; FLETCHER, 2003), o que pode nos indicar que dentre as gimnospermas, as Araucariaceae são mais especializadas. Os meristemas são constituídos por regiões histológicas distintas, que também diferem funcionalmente, cuja função está atrelada a sinais endógenos de regulação (RODRIGUES; KERBAUY 2009). As células meristemáticas são mantidas com base em sua posição em relação ao organizador, que é conhecido como centro organizador (CO).



FIGURA 02. MORFOLOGIA EXTERNA DOS ÁPICES DO TRONCO (A), RAMO (B) E GRIMPA (C) DA *A. angustifolia*. SECÇÕES LONGITUDINAIS DA MORFOLOGIA INTERNA DOS ÁPICES DO TRONCO (D), RAMO (E) E GRIMPA (F) OBTIDAS POR MEIO DE TÉCNICAS DE MICROSCOPIA DE LUZ. C = CORPO, ma = MERISTEMA APICAL, mf = MERISTEMA FUNDAMENTAL, pc = PROCÂMBIO, pf = PRIMÓRDIOS FOLIARES, T = TÚNICA. PODEMOS NOTAR A PRESENÇA DE CANAIS RESINÍFEROS PRÓXIMOS À BASE DOS PRIMÓRDIOS FOLIARES, INDICADOS POR SETAS VERDES (E-F). MAC DO TRONCO (J), RAMO (K) E GRIMPA (L) EM FORMATO DE DOMO. AS CÉLULAS APRESENTAM NÚCLEOS GRANDES (n) E DIVERSOS PEQUENOS VACÚOLOS DISPERSOS AO REDOR DO NÚCLEO (v). NA TÚNICA (T) PREDOMINAM AS DIVISÕES ANTICLINAIS (SETAS DUPLAS).



FONTE: A autora (2018).



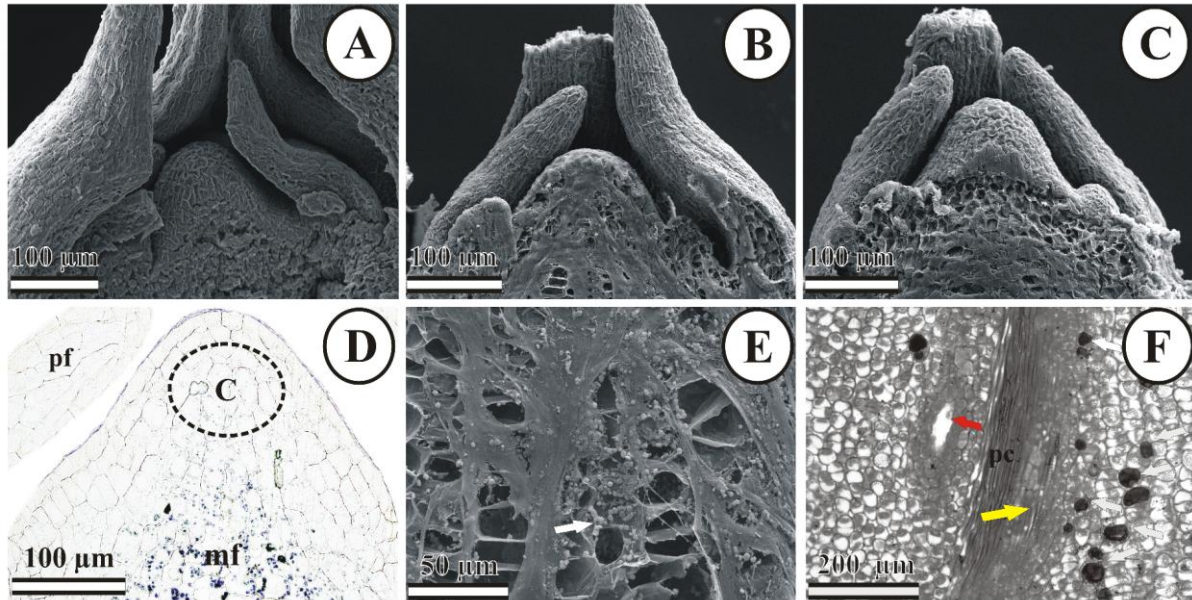
As células que formam a túnica e o corpo de *A. angustifolia* apresentam núcleos grandes, que ocupam quase todo o citoplasma da célula. O sentido das divisões celulares das camadas L1 e L2 é predominantemente anticlinal no MAC do tronco, o que permite cada camada manter um crescimento independente. Já no MAC do ramo e grimpia a camada L2 parece ter divisões anticlinais e periclinais, com predomínio das divisões anticlinais. Na região mais periférica, próximo aos primórdios foliares, as divisões celulares de L1 e L2 são predominantemente anticlinais, enquanto que na região do ápice podem ocorrer células com divisão anticlinal e em menor proporção, células que se dividem periclinamente. Nas demais camadas internas (L3) do MAC dos três caules, as divisões celulares ocorrem em todos os sentidos, não se observando um padrão ou sentido único das divisões.

As células do MAC apresentam formato isodiamétrico, com parede celular delgada. As células derivadas apresentam diversos vacúolos de tamanho reduzido distribuídos pela célula (FIGURA 02.J-L). Algumas células abaixo do meristema fundamental (MF) estão diferenciadas, pois além de expandidas apresentam conteúdos específicos, como mucilagem (FIGURA 03.F). Na família Araucariaceae, as células mucilaginosas estão presentes em indivíduos do gênero *Araucaria* e *Wollemia*, estando ausentes em *Agathis* (BURROWS; BULLOCK, 1999).

Na parede celular, identificamos compostos celulósicos e na região periférica das células, o teste com lugol confirmou a distribuição de amiloplastos, que se concentram principalmente próximo ao núcleo (Figura 03.D-E). As regiões de maior concentração dos amiloplastos são o meristema de fileiras (*rib meristem*) e meristema fundamental. Os amiloplastos presentes no ápice caulinar do ramo e grimpia, assim como o núcleo das células que compõem o meristema fundamental, tendem a se acumular lateralmente na porção inferior das células, muito possivelmente devido ao efeito da gravidade e da orientação plagiotrópica.

Na região abaixo do meristema fundamental, nota-se que as células estão diferenciadas, os canais resiníferos estão presentes e distribuídos na base dos primórdios foliares (FIGURA 03.F). O procâmbio estende-se aos primórdios foliares e está organizado em um anel contínuo. Em secção longitudinal suas células são alongadas (Figura 03.F). A coloração com azul de toluidina indicou a presença de polissacarídeos ácidos na parede celular.

FIGURA 03. FOTOMICROGRAFIAS (MEV) DOS ÁPICES CAULINARES EM SECÇÕES LONGITUDINAIS DO TRONCO (A), RAMO (B) E GRIMPA (C) DA *A. angustifolia*, MOSTRANDO PRIMÓRDIOS FOLIARES (pf) E EVIDENCIANDO O FORMATO DE DOMO DO. AMILOPLASTOS FORAM IDENTIFICADOS ATRAVÉS DO TESTE COM LUGOL (D) E TAMBÉM PODEM SER OBSERVADOS NAS IMAGENS FEITAS POR MEV (E) (FOTOMICROGRAFIAS DO ÁPICE DO RAMO), PRINCIPALMENTE NA REGIÃO ABAIXO DO CORPO, NO MERISTEMA FUNDAMENTAL (mf). NA REGIÃO DO PROCÂMBIO OBSERVAM-SE TRAQUEÍDES DIFERENCIADAS (SETA AMARELA). CANAIS RESINÍFEROS ESTÃO PRESENTES AO LONGO DOS ÁPICES CAULINARES, NA BASE DOS PRIMÓRDIOS FOLIARES (SETA VERMELHA) (F).



FONTE: A autora (2018).

O MAC é organizado ainda na embriogênese de plantas espermatófitas, sendo por isso, classificado também como meristema primário junto com o MAR (RODRIGUES; KERBAUY 2009). ROGGE-RENNER et al. (2013) descreveram a organização morfológica, histológica e características ultra-estruturais do MAC e MAR de embriões zigóticos de *A. angustifolia* em estágio cotiledonar. O estudo evidenciou a presença de proteínas totais, grãos de amido, núcleos grandes com um ou dois nucléolos, parede celular delgada e irregular composta por celulose, com plasmodesmas conectando as células. PANZA et al., (2002) verificaram no MAC de embriões zigóticos de *A. angustifolia* a presença frequente de compostos lipídicos e amiloplastos, e nas células derivadas há vacúolos com proteínas armazenadas. As mitocôndrias são numerosas e parecem estar ativas (PANZA et al., 2002). De maneira muito similar às células meristemáticas de angiospermas, *A. angustifolia* exhibe células com características pluripotentes (ROGGE-RENNER et al., 2013).

De acordo com as interações celulares, as células podem ser classificadas como pluripotentes ou totipotentes. As células do meristema apical, formadas na embriogênese zigótica, são classificadas como pluripotentes, enquanto as células de

calos são totipotentes (VERDEIL et al., 2007). As células pluripotentes podem originar a maior parte das células, porém não todas, que formam o corpo do vegetal adulto (VERDEIL et al., 2007). As células pluripotentes são isodiamétricas com um núcleo de forma esférica contendo um ou mais nucléolos e citoplasma denso (VERDEIL et al., 2007), o que está de acordo com as características observadas em nosso trabalho.

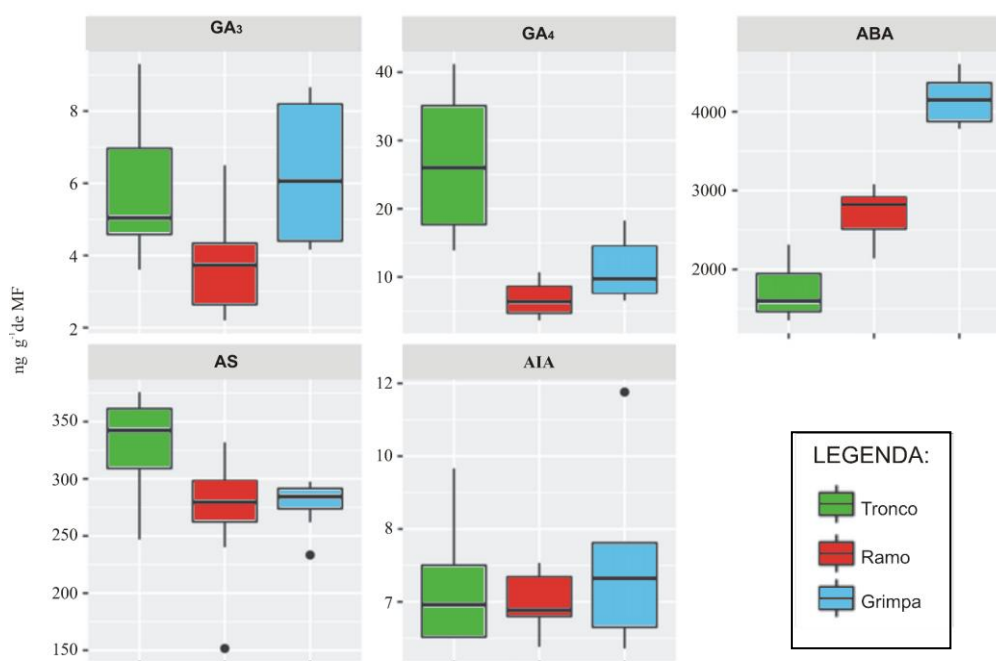
O meristema apical do ramo e da grimpá são derivados do MAC do tronco e formam os meristemas axilares de *A. angustifolia* (IRITANI; ZANETTE; CISLINSKY, 1992), porém, uma vez desenvolvidos são também meristemas apicais. Contudo, no tronco a planta apresenta na axila de cada acícula um agrupamento de células meristemáticas, que não formam propriamente gemas axilares como em outras plantas, e são por isso denominadas de „pólos meristemáticos“, que possuem a capacidade de se desenvolver morfogenicamente como um tronco, em condições bem específicas e a intervalos regulares há a formação de ramos plagiotrópicos (IRITANI; ZANETTE; CISLINSKY, 1992), que estão organizados aparentemente em verticilos, porém numa análise mais aproximada vê-se que estes ramos desenvolvem-se muito próximos, formando pseudo-verticilos, com uma disposição em espiral. O mecanismo que leva o tronco a possuir tanto a capacidade de formar ramificações ortotrópicas quanto plagiotrópicas ainda é desconhecido.

### 3.3.2 Composição de GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, AS, ABA e AIA livre presentes nos ápices caulinares do tronco, ramo e grimpá de *A. angustifolia* com arquitetura típica segundo modelo de Rauh (Experimento 01)

O método utilizado para analisar a composição dos fitormônios permitiu a quantificação de Giberelina<sub>3</sub> (GA<sub>3</sub>), Giberelina<sub>4</sub> (GA<sub>4</sub>), Ácido Salicílico (AS), Ácido Abscísico (ABA) e Ácido Indol-3-acético livre (AIA livre) (FIGURA 04). Para os fitormônios GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, AS e ABA, observamos diferenças significativas entre pelo menos um par de ápices (TABELA 01). GA<sub>4</sub> apresentou um conteúdo mais expressivo do que GA<sub>3</sub> em *A. angustifolia*. Para AIA livre observamos sua presença em baixas quantidades nos ápices, em relação aos demais fitormônios, sem diferenças significativas, o que fica evidente também na curva de densidade apresentada (APÊNDICE 01). O fitormônio detectado em maior quantidade foi ABA

e o que apresentou menor quantidade foi AIA, com limites bem próximos ao mínimo para detecção e quantificação (FIGURA 04).

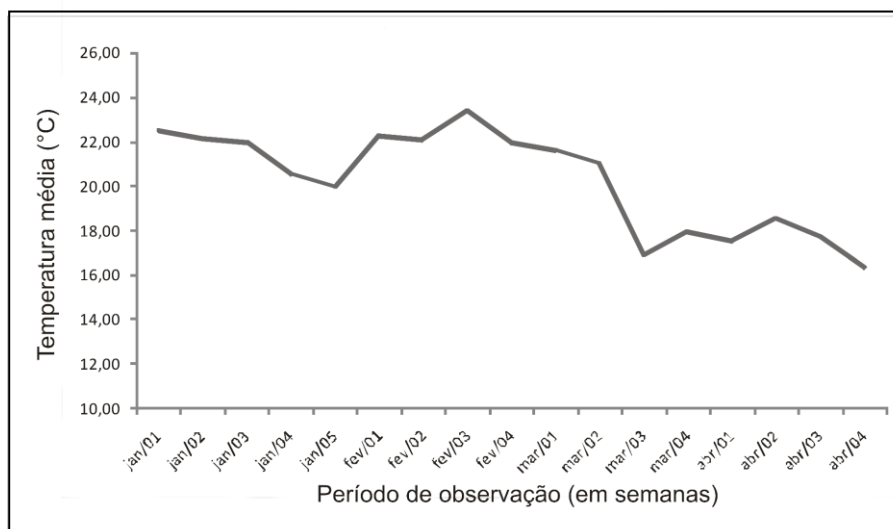
FIGURA 04. CONTEÚDO DE GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, ABA, AS E AIA LIVRE (ng g<sup>-1</sup> de MF) DOS ÁPICES CAULINARES DO TRONCO, RAMO E GRIMPA DE PLANTAS DE *A. angustifolia* ENXERTADAS A PARTIR DE PROPÁGULOS RETIRADOS DO TRONCO (EXPERIMENTO 01). NO GRÁFICO É POSSÍVEL IDENTIFICAR A MEDIANA (LINHA QUE SECCIONA OS RETÂNGULOS – SEGUNDO QUARTIL), OS QUARTIS MÍNIMOS E MÁXIMOS (PRIMEIRO E TERCEIRO QUARTIL) E A AMPLITUDE MÍNIMA E MÁXIMA DOS DADOS (BARRA COM LIMITE INFERIOR E SUPERIOR). NESTES GRÁFICOS É POSSÍVEL IDENTIFICAR A SIMETRIA E/OU ASSIMETRIA DOS DADOS E OUTLIERS INDICADOS EM PONTOS PRETOS.



FONTE: A autora (2018).

Os ápices caulinares da grimpa apresentaram a maior quantidade de ABA (4148,4 ng g<sup>-1</sup> de MF), seguido pelos ápices do ramo (2689,7 ng g<sup>-1</sup> de MF) e do tronco (1726,6 ng g<sup>-1</sup> de MF) (FIGURA 04), sendo que todos diferiram entre si estatisticamente (TABELA 01). O conteúdo mais elevado de ABA nos ápices de *A. angustifolia* em relação aos demais fitormônios ficou muito evidente em nosso estudo, e isto se deve, principalmente ao momento da coleta do material, que foi realizada no outono, na qual podemos notar que a temperatura média começou a diminuir (FIGURA 05). Em *A. nordmanniana*, uma conífera que apresenta plagiotropismo marcante em seus ramos, o conteúdo de ABA dos ápices manteve-se baixo durante quase todo o ano, porém apresentou um aumento expressivo que coincidiu com o início do outono e período de repouso vegetativo da planta (RASMUSSEN et al., 2010).

FIGURA 05. TEMPERATURA MÉDIA SEMANAL REGISTRADA NO PERÍODO DE JANEIRO/2017 A ABRIL/2017, NA ESTAÇÃO METEOROLÓGICA DO SIMEPAR EM PINHAIS/PR.



FONTE: SIMEPAR (2018).

Apesar de não ser o foco de nosso estudo, este resultado evidencia que *A. angustifolia* tem mecanismos fisiológicos de redução da taxa de crescimento durante períodos do ano, desencadeada por fatores extrínsecos e intrínsecos à planta, que necessita de uma investigação mais profunda. A dormência pode ocorrer em resposta ao fotoperíodo, temperatura ou ambos. Estudos envolvendo a dinâmica dos fitormônios em *A. angustifolia* durante o ano ainda não foram realizados. Contudo, Pereira et al. (2016) avaliou a atividade respiratória de tecidos internos de meristemas apicais de ramos plagiotrópicos de *A. angustifolia*, e verificou que durante o outono e inverno as gemas apicais apresentaram baixa atividade respiratória, indicando que as plantas se encontravam em baixa atividade metabólica. O crescimento dos ramos plagiotrópicos de *A. angustifolia* também foi limitado ou paralisado durante o outono/inverno (PEREIRA et al., 2016).

A dominância apical e o controle apical estão entre os principais fatores que determinam o padrão de ramificação e arquitetura das árvores. O controle apical refere-se à supressão do crescimento de um ramo subdominado exercida por um ramo dominante mais alto que funciona para manter a dominância da copa por um tronco central; esta regulação do crescimento concentra-se após a gema iniciar o seu desenvolvimento, dessa forma, é um passo a parte da dominância apical (WILSON, 2000; CLINE; HARRINGTON, 2007). A dominância apical é o controle que o ápice caulinar de um ramo em pleno crescimento exerce sobre as gemas

axilares e enfoca principalmente mecanismos que determinam se esta gema irá ou não se desenvolver (CLINE; HARRINGTON, 2007).

TABELA 01. COMPARAÇÕES 2X2 ENTRE O CONTEÚDO DE GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, ABA, AS E AIA LIVRE DOS ÁPICES CAULINARES DO TRONCO, RAMO E GRIMPA DA *A. angustifolia* (EXPERIMENTO 01), EM QUE O NÍVEL 2 É O NÍVEL DE REFERÊNCIA DO CONTRASTE, RAZÃO DA RESPOSTA É A RAZÃO DE CHANCES DO NÍVEL 1 EM RELAÇÃO AO NÍVEL 2, E O VALOR-P É O VALOR DE P ASSOCIADO A ESTE TESTE.

Nível 1	Nível 2	Razão da resposta (ng g <sup>-1</sup> de MF)	Erro padrão (ng g <sup>-1</sup> de MF)	Valor-p
<b>GA<sub>3</sub></b>				
Ápice do Tronco	Ápice do Ramo	1,55	0,28	0,02
Ápice do Tronco	Ápice da Grimpa	0,93	0,17	0,70
Ápice do Ramo	Ápice da Grimpa	0,60	0,10	0,01
<b>GA<sub>4</sub></b>				
Ápice do Tronco	Ápice do Ramo	3,96	1,09	0,000001
Ápice do Tronco	Ápice da Grimpa	2,39	0,66	0,000001
Ápice do Ramo	Ápice da Grimpa	0,60	0,15	0,04
<b>ABA</b>				
Ápice do Tronco	Ápice do Ramo	0,64	0,05	0,000001
Ápice do Tronco	Ápice da Grimpa	0,42	0,03	0,000001
Ápice do Ramo	Ápice da Grimpa	0,65	0,05	0,000001
<b>AS</b>				
Ápice do Tronco	Ápice do Ramo	1,15	0,07	0,02
Ápice do Tronco	Ápice da Grimpa	1,18	0,07	0,01
Ápice do Ramo	Ápice da Grimpa	1,03	0,06	0,62
<b>AIA</b>				
Ápice do Tronco	Ápice do Ramo	1,09	0,19	0,63
Ápice do Tronco	Ápice da Grimpa	0,92	0,16	0,63
Ápice do Ramo	Ápice da Grimpa	0,84	0,14	0,63

FONTE: A autora (2018).

*Araucaria angustifolia* é uma espécie com forte dominância apical de seu tronco, com um padrão de ramificação bem característico e organização hierárquica. Porém parece que a dominância apical é variável conforme o tipo de caule da planta (tronco, ramo e grimpa), já que estacas de grimpa enraizadas foram incapazes de inibir brotações em sua base, indicando uma fraca dominância apical (dados não publicados), ao contrário do tronco. Wilson (2000) afirmou que, embora pareça provável que os hormônios desempenham um papel importante no controle apical, houve relativamente poucas pesquisas feitas sobre esse tema. Mesmo depois de revisar trabalhos pertinentes sobre estudos hormonais, incluindo possíveis efeitos na orientação dos ramos, Wilson (2000) ressalta que o mecanismo de ação dos hormônios no controle apical permanece desconhecido.

O conteúdo de GA<sub>3</sub> dos ápices caulinares do tronco foi de 5,87 ng g<sup>-1</sup> de MF, que não diferiu estatisticamente do conteúdo observado nos ápices caulinares da

grimpa (6,28 ng g<sup>-1</sup> de MF) (TABELA 01). Já a quantidade de GA<sub>3</sub> observada nos ápices caulinares do ramo (3,78 ng g<sup>-1</sup> de MF) foi menor do que o observado nos ápices caulinares do tronco e da grimpá (TABELA 01). Mais de 130 giberelinas com ocorrência natural em plantas foram descritas, exercendo diversos efeitos fisiológicos (KONG et al., 2008). Em coníferas tem se atribuído ao GA<sub>1</sub> e GA<sub>3</sub> um papel no crescimento vegetativo, e para GA<sub>4</sub> e GA<sub>7</sub> papel na floração (DUNBÉRG; ODEN, 1983). Porém, isto não parece ser uma regra geral, já que em *Pinus radiata*, o conteúdo de GA<sub>3</sub> manteve-se constante, tanto em gemas vegetativas quanto em gemas reprodutivas masculinas, e o conteúdo de GA<sub>4</sub> teve um incremento nas gemas masculinas no início da fase reprodutiva, apesar de também ser detectada a níveis mais baixos, em torno de 10 ng g<sup>-1</sup> de massa seca, em gemas de plantas jovens (FERNÁNDEZ et al., 2003).

As giberelinas, em geral, apresentam um efeito notório na indução de floração precoce e na formação de estróbilos masculinos em coníferas (KONG et al., 2008). O maior conteúdo de giberelinas endógenas em coníferas é de GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub> e GA<sub>9</sub> (WANG et al., 1992). A giberelina detectada em maior quantidade dentre as duas avaliadas nos ápices caulinares de *A. angustifolia* foi GA<sub>4</sub> (TABELA 01). O conteúdo de GA<sub>4</sub> nos ápices caulinares do tronco (26,77 ng g<sup>-1</sup> de MF) foi maior do que o observado nos ápices caulinares do ramo (6,76 ng g<sup>-1</sup> de MF) e grimpá (11,22 ng g<sup>-1</sup> de MF) (FIGURA 04). A diferença entre o conteúdo de GA<sub>4</sub> quantificado nos ápices caulinares do ramo e grimpá também foi significativa (TABELA 01). Devido às plantas estarem em pleno crescimento vegetativo, sem indícios de iniciar a fase reprodutiva, é possível que em *A. angustifolia* a GA<sub>4</sub> aja mais efetivamente no crescimento do que GA<sub>3</sub>. O tronco apresenta crescimento longitudinal finito (60 a 70 anos) e crescimento radial ilimitado, ao contrário de ramos e grimpas, que apresentam crescimento limitado (ZANETTE et al., 2017). É bem provável que a GA<sub>4</sub> tenha alguma relação com este padrão de crescimento diferenciado entre os três caules.

Os ápices caulinares do tronco apresentaram 329,43 ng g<sup>-1</sup> de MF do fitormônio Ácido Salicílico (AS). Os ápices caulinares do ramo apresentaram 285,93 ng g<sup>-1</sup> de MF de AS e os ápices caulinares da grimpá apresentaram 278,19 ng g<sup>-1</sup> de MF de AS (TABELA 01). Nota-se que ápice do tronco apresentou maior quantidade de AS que os demais. O conteúdo apresentado pelo ápice do ramo e grimpá não

diferiram entre si (TABELA 01). As plantas passam constantemente por diversas situações de estresses, como oscilações de temperatura, umidade, radiação solar, ataque de pragas ou patógenos, dentre outros, e modulam respostas de defesa de forma a superar tais estresses e retornar ao metabolismo normal (DEUNER et al., 2015).

Desta forma, as plantas conseguem mudar a constituição de compostos moleculares como um mecanismo de resposta. Envolvidos neste processo de sinalização, dentre outras moléculas, estão os fitormônios AS, ABA, AJ e etileno, que induzem a expressão de muitos genes por meio de diferentes rotas (CAO; YOSHIOKA; DESVEAUX, 2011). Este conteúdo de AS nos ápices de *A. angustifolia* pode ser em decorrência das mudanças de temperatura e fotoperíodo, sendo necessário para a planta se ajustar às novas condições.

O conteúdo de AIA livre nos ápices caulinares do tronco foi de 6,53 ng g<sup>-1</sup> de MF, nos ápices do ramo foi de 5,98 ng g<sup>-1</sup> de MF e nos ápices da grimpia foi de 7,10 ng g<sup>-1</sup> de MF (TABELA 01). Não foi verificada diferença estatística para o conteúdo de AIA entre os ápices caulinares de *A. angustifolia* (TABELA 01). Após um meristema axilar ter seu crescimento desencadeado para formar um novo ramo, o mesmo se converte em um meristema apical. É possível que após o desenvolvimento dos pólos meristemáticos, cada ápice dos novos ramos adquira certa liberdade em relação ao ápice do tronco, crescendo livre do controle apical exercido pelo tronco, e tenha mecanismos distintos e independentes de regulação hormonal e controle da ramificação das gemas axilares que estão adjacentes a ele.

Geralmente rápidas mudanças nos níveis hormonais são responsáveis pela iniciação de importantes processos de desenvolvimento, como novos órgãos, enquanto que a manutenção da concentração hormonal em níveis estáveis é necessária para o crescimento posterior destes órgãos. A distância entre os meristemas que constituem uma árvore também é determinante para definir sua arquitetura (HALLÉ, 2010). Em ramificações novas, a distância entre os meristemas apicais é menor, havendo uma inter-relação hierárquica, que funciona de maneira coordenada (HALLÉ, 2010), e acaba inibindo ou controlando o desenvolvimento das gemas axilares que estão abaixo da gema apical terminal, devido principalmente à interferência de auxinas e citocininas (CLINE; HARRINGTON, 2007).



As auxinas são sintetizadas em primórdios foliares e meristemas apicais (LUDWIG-MÜLLER, 2011) e exercem funções importantes na formação de raízes laterais, embriões e manutenção na organização dos meristemas (FIGUEIREDO et al., 2015). O AIA é a principal auxina endógena, cuja função se dá no alongamento e diferenciação celular (TANAKA et al., 2014).

Em *Abies nordmanniana*, um estudo que avaliou a relação de fitormônios com a formação de ramificações, apontou uma variação no conteúdo de fitormônios durante o ano nas gemas apicais de ramos plagiotrópicos e ortotrópicos. Houve uma drástica queda nos níveis de AIA nas gemas apicais, a níveis quase indetectáveis no período de outono/inverno (RASMUSSEN et al., 2010), assim como no presente estudo foi observado baixo conteúdo de AIA nos ápices da *A. angustifolia* no outono. Os níveis geralmente baixos de AIA parecem consistentes com a pequena quantidade de expansão do tecido que é necessária enquanto a organogênese está ocorrendo dentro das gemas. Uma possível interpretação é que o baixo nível de auxina também evita a brotação prematura de ramos a partir das gemas axilares (RASMUSSEN et al., 2010). Durante a fase de alongamento mais intensa do ramo, ocorre um gradiente na concentração de auxina, com a maior quantidade na parte basal e uma concentração decrescente em direção ao ápice do caule em formação, com menor quantidade nas gemas apicais (ALDEN, 1971).

Em *A. nordmanniana*, Rasmussen et al. (2010) sugerem que a síntese de auxina ocorre em múltiplas fontes dentro dos tecidos e acículas do caule, gerando um gradiente descendente ao longo do desenvolvimento do tronco principal. Essas fontes não são afetadas pela excisão de gemas. GARCIA (2018) verificou que acículas de ramos de *A. angustifolia* apresentaram maior quantidade de AIA livre do que acículas de tronco. Esta diferença ficou ainda mais marcante em plantas mais velhas. Contudo, o estudo não deixa claro em que época o material vegetal foi coletado.

Sabe-se que *A. angustifolia* é uma planta com forte dominância apical, e que esta característica influencia na sua arquitetura (CONSTANTINO, 2017). AIA e citocininas são apontados como os hormônios-chave da dominância apical em plantas (CLINE; HARRINGTON, 2007). Porém, dada a época da coleta do material e diante do alto conteúdo de ABA, indicando que as plantas se encontravam em início

de repouso vegetativo, é possível que o baixo conteúdo de AIA livre das amostras deu-se justamente pela baixa atividade mitótica do ápice caulinar.

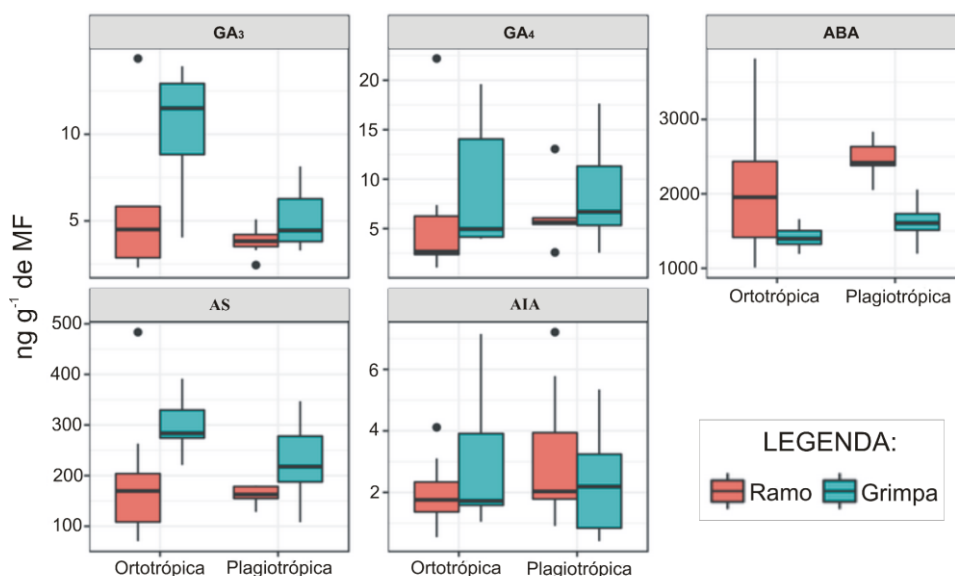
Em *Pinus silvestris*, AIA foi detectado em gemas apicais caulinares e também em brotações durante todo o período vegetativo, exceto durante a dormência no inverno. A maior concentração de AIA em *P. silvestris* ocorreu durante a brotação dos ramos na primavera e início de verão (ALDEN, 1971). O alto nível de auxina em gemas e/ou em ramos durante a brotação é considerado como resultado do aumento da atividade do ápice caulinar e não o contrário (PSOTA; KLICOVÁ; KRALÍK, 1995). O nível baixo durante a fase de dormência é provavelmente o resultado de uma baixa atividade do ápice (PSOTA; KLICOVÁ; KRALÍK, 1995).

Um estudo em longo prazo, com coletas sucessivas ao longo do crescimento e desenvolvimento da *A. angustifolia* é necessário para se ter uma conclusão a respeito do conteúdo de AIA e também dos demais fitormônios, já que em nosso trabalho realizamos a coleta de material em uma única data, no outono, quando possivelmente as plantas já estavam entrando em período de repouso, o que também ficou evidente pelo elevado conteúdo de ABA dos ápices caulinares.

### 3.3.3 Composição de GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, AS, ABA e AIA livre presentes nos ápices caulinares do ramo e grimpá de *A. angustifolia* em plantas ortotrópicas e plagiotrópicas com morfologia de ramo (Experimento 02)

Para a maioria dos fitormônios não se têm claramente um efeito do plagiotropismo ou ortotropismo em *A. angustifolia*, exceto para GA<sub>3</sub>, muito pelo fato da sua alta concentração no ápice da grimpá da planta ortotrópica. A planta ortotrópica teve em média 7,45 ng g<sup>-1</sup> de MF de GA<sub>3</sub>, enquanto a planta plagiotrópica apresentou em média 4,39 ng g<sup>-1</sup> de MF (FIGURA 06). O conteúdo de GA<sub>3</sub> dos ápices da grimpá (7,23 ng g<sup>-1</sup> de MF) foi superior ao quantificado no ramo (4,51 ng g<sup>-1</sup> de MF) (FIGURA 06), análogo ao resultado encontrado no Experimento 01. É possível que este hormônio possa ter alguma relação com o polimorfismo destes caules, tendo em vista que a quantidade deste fitormônio praticamente foi semelhante, mesmo em plantas com idades distintas, porém para resultados mais conclusivos são necessários estudos mais aprofundados.

FIGURA 06. CONTEÚDO DE GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, ABA, AS E AIA LIVRE (ng g<sup>-1</sup> de MF) DE ÁPICES CAULINARES DO RAMO E GRIMPA DE PLANTAS ORTOTRÓPICAS E PLAGIOTRÓPICAS DE *A. angustifolia* ENXERTADAS A PARTIR DE PROPÁGULOS RETIRADOS DO RAMO (EXPERIMENTO 02). NO GRÁFICO É POSSÍVEL IDENTIFICAR A MEDIANA (LINHA QUE SECCIONA OS RETÂNGULOS – SEGUNDO QUARTIL), OS QUARTIS MÍNIMOS E MÁXIMOS (PRIMEIRO E TERCEIRO QUARTIL) E A AMPLITUDE MÍNIMA E MÁXIMA DOS DADOS (BARRA COM LIMITE INFERIOR E SUPERIOR). NESTES GRÁFICOS É POSSÍVEL IDENTIFICAR A SIMETRIA E/OU ASSIMETRIA DOS DADOS E *OUTLIERS* (PONTOS PRETOS).



FONTE: A autora (2018).

Em relação aos teores de GA<sub>4</sub>, que foram próximos ao de GA<sub>3</sub> (FIGURA 06), não observamos efeitos significativos para tipo de gema nem tropismo da planta (TABELA 02). Este resultado também corrobora para a hipótese de que GA<sub>4</sub> esteja relacionado ao crescimento vegetativo da planta, pois em plantas mais jovens, em pleno crescimento vegetativo, a GA<sub>4</sub> estava presente em maior quantidade (Experimento 01), porém em plantas com idades mais avançadas e próximas de cessar o crescimento vegetativo (Experimento 02), a quantidade de GA<sub>4</sub> encontrada foi sensivelmente menor. Para ABA e AS observamos diferenças significativas entre ápices caulinares do ramo e da grimpá, porém o tropismo das plantas não influenciou no conteúdo destes hormônios nos ápices estudados (TABELA 02).

O ABA apresentou a mais alta quantidade dentre os fitormônios analisados nos ápices caulinares de *A. angustifolia* (2253,7 ng g<sup>-1</sup> de MF no ramo e 1518,3 ng g<sup>-1</sup> de MF na grimpá) (FIGURA 06), confirmando o que já foi verificado no Experimento 01 (FIGURA 04). Novamente, esse alto nível de ABA está associado à diminuição da temperatura, e em consequência de um possível mecanismo de dormência vegetativa em *A. angustifolia*. Em relação ao tropismo das plantas, não foi verificado

efeito significativo de ABA, porém, em relação aos ápices caulinares, o teor de ABA das grimpas foi menor do que o observado nos ápices do ramo (TABELA 02). Este resultado difere do observado no Experimento 01, em que os ápices da grimpas apresentaram maior conteúdo de ABA do que os ápices do ramo e tronco. Possivelmente esta diferença ocorreu devido à idade distinta dos enxertos e consequentemente do material coletado.

TABELA 02. COMPARAÇÕES 2X2 ENTRE O CONTEÚDO DE GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, ABA, AS E AIA LIVRE DOS ÁPICES CAULINARES DO RAMO E GRIMPA DA *A. angustifolia* E ENTRE PLANTAS ORTOTRÓPICAS E PLAGIOTRÓPICAS (EXPERIMENTO 02), EM QUE O NÍVEL 2 É O NÍVEL DE REFERÊNCIA DO CONTRASTE, RAZÃO DA RESPOSTA É A RAZÃO DE CHANCES DO NÍVEL 1 EM RELAÇÃO AO NÍVEL 2.

Nível 1	Nível 2	Razão da resposta (ng g <sup>-1</sup> de MF)	Erro padrão (ng g <sup>-1</sup> de MF)	Valor-p
<b>GA<sub>3</sub></b>				
Ápice do Ramo	Ápice da Grimpas	0,62	0,10	0,004
Planta Ortotrópica	Planta Plagiotrópica	1,70	0,28	0,001
<b>GA<sub>4</sub></b>				
Ápice do Ramo	Ápice da Grimpas	0,72	0,26	0,36
Planta Ortotrópica	Planta Plagiotrópica	1,01	0,36	0,97
<b>ABA</b>				
Ápice do Ramo	Ápice da Grimpas	1,48	0,13	0,000001
Planta Ortotrópica	Planta Plagiotrópica	0,86	0,11	0,23
<b>AS</b>				
Ápice do Ramo	Ápice da Grimpas	0,68	0,11	0,02
Planta Ortotrópica	Planta Plagiotrópica	1,24	0,19	0,16
<b>AIA</b>				
Ápice do Ramo	Ápice da Grimpas	0,94	0,27	0,83
Planta Ortotrópica	Planta Plagiotrópica	0,91	0,26	0,73

FONTE: A autora (2018).

O efeito que os fitormônios desempenham nas plantas é complexo e depende de vários fatores, como concentração associada ao tecido ou órgão vegetal, estágio de desenvolvimento da planta, sensibilidade diferencial e interação com outros fitormônios. As plantas do Experimento 02 estavam com seis anos de idade a partir da enxertia e com o crescimento vegetativo próximo de cessar, principalmente das grimpas. Já as plantas do Experimento 01 possuíam 03 anos de idade após a enxertia, e estavam em pleno crescimento vegetativo, com ramificações e ápices mais jovens.

Sabe-se que em plantas adultas as grimpas apresentam tempo de vida limitado de até 5-7 anos (ZANETTE et al., 2017), possivelmente devido à função mais relacionada à fotossíntese deste caule na planta (ver adiante no CAPÍTULO II e III), que sofre abscisão levando consigo as acículas. É provável que a sensibilidade

ao fitormônio ABA seja diferente entre órgãos, no caso ápices caulinares, com idades diferentes, e que ápices de caules mais jovens necessitem de uma concentração maior de ABA durante o período de repouso vegetativo por estarem ainda em crescimento.

O conteúdo de AS no ápice do ramo ( $179,42 \text{ ng g}^{-1}$  de MF) foi menor do que o observado na grimpá ( $264,85 \text{ ng g}^{-1}$  de MF) (TABELA 02). Para o fitormônio AS não foi observado efeito do tropismo, apenas diferenças entre ápices de ramos e grimpas (TABELA 02). As plantas plagiotrópicas apresentaram  $195,85 \text{ ng g}^{-1}$  de MF de AS e as ortotrópicas  $243,82 \text{ ng g}^{-1}$  de MF.

AIA novamente foi o fitormônio que apresentou as menores quantidades dentre os que foram analisados (FIGURA 06). O conteúdo dos ápices do ramo foi de  $2,49 \text{ ng g}^{-1}$  de MF e dos ápices da grimpá foi de  $2,64 \text{ ng g}^{-1}$  de MF (FIGURA 07). As plantas ortotrópicas apresentaram  $2,44 \text{ ng g}^{-1}$  de MF de AIA livre e as plagiotrópicas  $2,69 \text{ ng g}^{-1}$  de MF (FIGURA 06). Para nenhuma das covariáveis (tropismo ou tipo de ápice) observou-se diferenças significativas para o conteúdo de AIA (TABELA 02).

O efeito das auxinas no tropismo das plantas já é conhecido (MUDAY, 2001). O deslocamento de ramos ortotrópicos de *A. nordmanniana* de sua orientação natural para uma orientação mais horizontal gerou um acúmulo assimétrico de auxina, como uma resposta característica de sinais gravitrópicos (MUDAY, 2001). Contudo, essa deposição assimétrica de auxina foi temporária durante o deslocamento do caule, e ramos que são naturalmente plagiotrópicos devem possuir um sistema de regulação diferente de ramos ortotrópicos.

A decapitação do ápice caulinar do tronco não afetou a orientação do crescimento de ramos plagiotrópicos em *A. nordmanniana* (VEIERSKOV et al., 2007), o que indica que o plagiotropismo é regulado dentro do próprio ramo. Ramos plagiotrópicos de *A. nordmanniana* apresentam um crescimento hiponástico (diagonal) durante o início do desenvolvimento destes, mas logo assumem a orientação horizontal (VEIERSKOV et al., 2007). Em *A. angustifolia* percebemos um comportamento semelhante no início da ramificação, com os ápices dos ramos numa posição tendendo para a vertical e que após o crescimento inicial dos ramos, os mesmos assumem uma orientação horizontal.

Wilson (2000) levantou a hipótese de que provavelmente não há nenhum mecanismo único para todos os fenômenos envolvidos no controle apical. Os

mecanismos são provavelmente diferentes para os processos de crescimento que determinam o tamanho da nova brotação, o alongamento da ramificação e atividade cambial. Os dados obtidos no presente estudo corroboram com esta hipótese. Ainda segundo Veierskov et al. (2007) o plagiotropismo é um fenômeno provavelmente regulado dentro do próprio ramo, no qual a distribuição hormonal e a percepção de sinal para o desenvolvimento de um ramo plagiotrópico podem ser semelhantes ao de uma ramificação ortotrópica.

### 3.4 CONCLUSÃO

Para as condições em que o experimento foi realizado, levando-se em conta principalmente a coleta do material vegetal no outono para a análise de fitormônios, conclui-se que:

I. Os ápices caulinares apresentam o meristema apical com uma organização estrutural típica de angiosperma, indicando que *A. angustifolia* apresenta-se mais especializada; o meristema apical dos três caules apresenta células com características pluripotentes.

II. O polimorfismo dos ramos em *A. angustifolia* é provavelmente regulado por mecanismos intrínsecos de cada ramo, e independe do controle apical. A distribuição hormonal entre os ápices dos três tipos de caule apresentou diferenças para vários hormônios. GA<sub>3</sub>, possivelmente tem relação entre o polimorfismo dos ápices do ramo e da grimpá, e GA<sub>4</sub> pode ter relação com o polimorfismo do tronco, devido ao crescimento mais pronunciado que este caule apresenta.

III. A orientação plagiotrópica ou ortotrópica dos ápices caulinares dos ramos da *A. angustifolia* não apresenta uma relação clara com o conteúdo de fitormônios analisado. Contudo, são necessários novos estudos com plantas de diferentes idades e ao longo do ano, para de fato sabermos se outros fitormônios têm ou não relação com o polimorfismo do caule em *A. angustifolia*.

## REFERÊNCIAS

- ALDEN, T. Seasonal variations in the occurrence of indole-3-acetic-acid in buds of *Pinus silvestris*. **Physiologia Plantarum**, v. 25, n. 1, p. 54-57, 1971. doi: 10.1111/j.1399-3054.1971.tb01087.x.
- ALONI, R.; LANGHANS, M.; ALONI, E.; ULLRICH, C. I. Role of cytokinin in the regulation of root gravitropism. **Planta**, v. 220, n. 1, p. 177-182, 2004. doi: 10.1007/s00425-004-1381-8.
- BURROWS, G.; BULLOCK, S. Leaf anatomy of Wollemi pine (*Wollemia nobilis*, Araucariaceae). **Australian Journal of Botany**, v. 47, n. 5, p. 795–806, 1999. doi: 10.1071/BT98019.
- CAO, F. Y.; YOSHIOKA, K.; DESVEAUX, D. The roles of ABA in plant-pathogen interaction. **Journal of Plant Resources**, v. 124, n. 4, p. 489-499, 2011. doi: 10.1007/s10265-011-0409-y.
- CARLES, C. C, FLETCHER, J. C. Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. **Trends in plant science**, v. 8, n. 8, p. 394-401, 2003. doi: 10.1016/S1360-1385(03)00164-X.
- CASELLA, G.; BERGER, R. L. **Statistical inference**. Boston: Duxbury Press, 2<sup>a</sup> ed., 660 p, 2002.
- CLINE, M. G.; HARRINGTON, C. A. Apical dominance and apical control in multiple flushing of temperate woody species. **Canadian Journal of Forestry Research**, v. 37, p. 74-83, 2007. doi: 10.1139/X06-218.
- CONSTANTINO, V. **Nutrição de mudas e morfogênese da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. submetida à enxertia**. 133 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal - Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017. Disponível em: <<https://goo.gl/tRNf12>> Acesso em: 15/02/2018.
- DEUNER, C.; BORGES, C. T.; ALMEIDA, A. S.; MENEGHELLO, G. E.; TUNES, L. V. M. Ácido jasmônico como promotor de resistência em plantas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 275-281, 2015. Disponível em: 62<<https://goo.gl/eSeiki>> Acesso em: 12/01/2018.
- DOBREV, P. I.; VANKOVA, R. Quantification of abscisic acid, cytokinin, and auxin content in salt-stressed plant tissues. **Methods Mol. Biology**, v. 913, p. 251-261, 2012. doi: 10.1007/978-1-61779-986-0\_17.
- FERNÁNDEZ, H.; FRAGA, M. F.; BERNARD, P.; REVILLA, M. A. Quantification of GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub>, GA<sub>9</sub> and GA<sub>20</sub> in vegetative and male cone buds from juvenile and mature trees of *Pinus radiata*. **Plant Growth Regulation**, v. 40, n. 3, p. 185-188, 2003. doi: 10.1023/A:1025070707899.

FIGUEIREDO, D. D.; BATISTA, R. A.; ROSZAK, P. J.; KÖHLER, C. Auxin production couples endosperm development to fertilization. **Nature Plants**, v. 1, p. 15184. 2015. doi: 10.1038/nplants.2015.184.

GASPAR, R. G. B. **Enxertia de copa e predição de hábitos de crescimento em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze**. 80 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018. Disponível em: <<https://goo.gl/RH2oBk>> Acesso em: 16/05/2018.

GOVIL, C. M. **Gymnosperms extinct and extant**. Delhi: Krishna Prakashan Media Ltda, 1 ed., 332 p., 2007.

HALLÉ, F. Arquitectura de los árboles. **Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica**, v. 45, n. 3-4, p. 405-418, 2010. Disponível em: <<https://goo.gl/RQhDJB>> Acesso em: 15/02/2018.

HALLÉ, F.; OLDEMAN, R. A. A.; TOMLINSON, P. B. **Tropical trees and forests. An architectural analysis**. Berlin: Springer Verlag, 1978. 444 p. doi: 10.1007/978-3-642-81190-6.

HEISDRA, R.; SABATINI, S. Plant and animal stem cells: similar yet different. **Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 5, p. 301-312, 2014. doi: 10.1038/nrm3790.

IRITANI, C.; ZANETTI, F.; CISLINSKY, J. Aspectos anatômicos da cultura in vitro de *Araucaria angustifolia*. I. Organização e desenvolvimento dos meristemas axilares ortotrópicos de segmentos caulinares. **Acta Biológica Paranaense**, v. 21, n. 1,2,3,4, p. 57-76, 1992. doi: 10.5380/abpr.v21i0.741.

KOEHLER, A. B. **Modelagem biométrica e morfometria em povoamentos jovens de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze., em Tijucas do sul, Estado do Paraná**. 142 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009. Disponível em: <<https://goo.gl/EHmzKs>> Acesso em: 15/02/2018.

KONG, L.; ABRAMS, S.; OWEN, S. J.; GRAHAM, H.; ADERKAS, P. V. Phytohormones and their metabolites during long shoot development in Douglas-fir following cone induction by 63 Gibberellins injection. **Tree Physiology**, v. 28, p. 1357-1364, 2008. doi: 10.1093/treephys/28.9.1357.

LAMOTTE, C. E.; PICKARD, B. G. Control of gravitropic orientation. II. Dual receptor model for gravitropism. **Functional Plant Biology**, v. 31, n. 2, p. 109-120, 2004. doi: doi.org/10.1071/FP03089.

LUDWIG-MÜLLER, J. Auxin conjugates: Their role for plant development and in the evolution of land plants. **Journal of Experimental of Botany**, v. 62, p. 1757-1773. 2011.

MUDAY, G. K. Auxins and tropisms. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 20, n. 3, p. 226-243, 2001. doi: 10.1007/s003440010027.



MÜLLER, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Plant Methods**, v. 7, n. 37, p. 1-11, 2011. doi: 10.1186/1746-4811-7-37.

NETER, J.; KUTNER, M.; NACHTSHEIM; WASSERMAN, W. Applied Linear Statistical Models. Nova Iorque: **McGraw-Hill/Irwin Companies**, 4<sup>a</sup> ed., 1408 p., 1996.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964. doi: 10.1007/BF01248568.

PANZA, V.; LÁINEZ, V.; MARODER, H.; PREGO, I.; MALDONADO, S. Storage reserves and water in mature seeds of *Araucaria angustifolia*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 140, n. 2, p. 273-281, 2002. doi: 10.1046/j.1095-8339.2002.00093.x.

PEREIRA, G. P.; ZANETTE, F.; BIASI, L. A.; CARVALHO, R. I. N. Atividade respiratória de meristemas apicais de ramos plagiotrópicos de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 1, p. 203-211, 2016. doi: 10.5902/198050921113.

PSOTA, V.; KLICOVÁ, S.; KRALÍK, J. Changes in the content of indole-3-acetic in the needles of dwarf pine in the course of the year. **Biologia Plantarum**, v. 37, n. 3, p. 453-455, 1995. doi: 10.1007/BF02913998.

RASMUSSEN, H. N.; VEIERSKOV, B.; MOLLER, J. H.; NORBÆK, R. „Lateral control”: phytohormone relations in the conifer treetop and the short- and long-term effects of bud excision in *Abies nordmanniana*. **Journal Plant Growth Regulation**, v. 29, n. 3, p. 268-279, 2010. doi: 10.1007/s00344-009-9132-5.

RODRIGUES, M. A.; KERBAUY, G. B. Meristemas: fontes de juventude e plasticidade no desenvolvimento vegetal. **Hoehnea**, v. 36, n. 4, p. 525-550, 2009. doi: 10.1590/S2236-89062009000400001.

ROGGE-RENNER, G. D.; STEINER, N.; SCHMIDT, E. C.; BOUZON, Z. L.; FARIAS, F. L.; GUERRA, M. P. Structural and component characterization of meristem cells in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze zygotic embryo. **Protoplasma**, v. 250, n. 3, p. 731-739, 2013. doi: 10.1007/s00709-012-0457-8.

SHIBATA, M.; COELHO, C. M. M.; ARALDI, C. G.; ADAN, N.; PERONI, N. Physiological and physical quality of local *Araucaria angustifolia* seed variety. **Acta scientiarum**, Maringá, v. 38, n. 2, p. 249-256, 2016. doi: 10.4025/actasciagron.v38i2.27976.

TANAKA, K.; HAYASHI, K.; NATSUME, M.; KAMIYA, Y.; SAKAKIBARA, H.; KAWAIDE, H.; KASHARA, H. UGT74D1 catalyzes the glucosylation of 2-oxindole-3-acetic acid in the auxin metabolic pathway in *Arabidopsis*. **Plant & cell physiology**, v. 55, n. 1, p. 218-228, 2014.

TEICHMANN, T.; MUHR, M. Shaping plant architecture. **Frontiers in Plant Science**, v. 6 (233), p. 1-18, 2015. doi: 10.3389/fpls.2015.00233.

THOMAS, P. *Araucaria angustifolia*. **The IUCN Red List of Threatened Species** **2013**: e.T32975A2829141. doi: 10.2305/IUCN.UK.2013-RLTS.T32975A2829141.en.

VEIERSKOV, B.; RASMUSSEN, H.; ERIKSEN, B; MOLLER, H. Plagiotropism and auxin in *Abies nordmanniana*. **Tree Physiology**, v. 27, n. 1, p. 149-153, 2007. doi: 10.1093/treephys/27.1.149.

VERDEIL, J. L.; ALEMANN, L.; NIEMENAK, N.; TRANBARGER, T. J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 6, p. 245–252, 2007. doi:10.1016/j.tplants.2007.04.002.

WANG, Q.; LITTLE, C. H. A.; SHENG, C.; ODÉN, P. C.; PHARIS, R. P. Effect of exogenous 65Gibberellins  $A_4/7$  on tracheid production, longitudinal growth and the levels of indole-3-acetic acid and gibberellins  $A_4$ ,  $A_7$  and  $A_9$  in the terminal shoot of *Pinus sylvestris* seedlings. **Physiologia Plantarum**, v. 86, n. 2, p. 202–208, 1992. doi: 10.1034/j.1399-3054.1992.860203.x.

WENDLING, I.; STUEPP, C. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. *Araucaria angustifolia* grafting: techniques, environments and origin of propagation material. **Bosque**, v. 37, n. 7, p. 285-293, 2016. doi: 10.4067/S0717-92002016000200007.

WILSON, B. F. Apical control of branch growth and angle in woody plants. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 5, p. 601-607, 2000. doi: 10.2307/2656846 Disponível em: <<https://goo.gl/fE3Qhh>> Acesso em: 16/03/2018.

ZANETTE, F.; DANNER, M. A.; CONSTANTINO, V.; WENDLING, I. Particularidades e biologia reprodutiva de *Araucaria angustifolia*. In: WENDLING, I.; ZANETTE, F. (eds) **Araucária: particularidades, propagação e manejo de plantios**. Embrapa, Brasília, p.15–39, 2017.

ZANETTE, F.; OLIVEIRA, L. S.; BIASI, L. A. Grafting of *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze through de four seasons of the year. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 4, p. 1364–1370, 2011. doi: 10.1590/S0100-29452011000400040.

## 4 CAPÍTULO II: MICROANÁLISE ELEMENTAR DO XILEMA SECUNDÁRIO DO CAULE DA *Araucaria angustifolia*

### RESUMO

O sistema caulinar de *A. angustifolia* apresenta-se polimórfico, onde o tronco principal é ortotrópico, enquanto que os ramos e as grimpas são plagiotrópicos. Estes se mantêm assim mesmo quando propagados vegetativamente. Pouco se sabe sobre as causas fisiológicas deste fenômeno e não há na literatura estudos que caracterizem a composição elementar de cada um destes caules. O objetivo deste estudo foi verificar se há diferenças entre a composição elementar do xilema secundário do tronco, ramo e grimpas da *A. angustifolia*. Para tanto, secções transversais de 200 µm dos três tipos de caules foram fixadas, desidratadas e submetidas ao ponto crítico. Técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura foram utilizadas para a caracterização anatômica qualitativa de cada um destes. A composição elementar foi determinada em percentual através da Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS), acoplado a um microscópio eletrônico de varredura. Para esta análise, o delineamento foi inteiramente casualizado, utilizando cinco plantas. Os espectros foram obtidos em três pontos distintos, coletados em três regiões de cada caule. Os resultados foram submetidos à ANOVA e ao teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para cada elemento foram ajustados modelos lineares mistos. Em geral, foram detectados oito elementos: carbono, oxigênio, sódio, silício, cálcio, fósforo, potássio e enxofre. O carbono e o oxigênio predominaram na composição do xilema secundário dos três caules, com cerca de 98% do conteúdo amostrado. Na grimpas houve maior percentual de enxofre e silício. O silício não foi detectado no tronco. Não houve diferença entre os caules quanto ao percentual de potássio, fósforo e sódio. O cálcio foi detectado em maior percentual no xilema secundário do tronco. O tronco, ramo e grimpas apresentam a estrutura do xilema secundário semelhante, caracterizada por traqueídes com paredes mais espessas no lenho tardio, e menos espessas no lenho inicial, sem canais resiníferos, e raios parenquimáticos homocelulares e predominantemente unisseriados. Os resultados mostram que há diferenças na composição elementar do xilema secundário entre os três caules, variando conforme sua função na planta, com predomínio de Ca no tronco, elemento que está relacionado à formação de madeira, e consequentemente função de sustentação, e Si e S na grimpas, sendo que este elemento se acumula em órgãos com maior transpiração, o que sugere que a grimpas tenha uma função análoga às folhas.

Palavras-chave: Espectroscopia por Energia Dispersiva. Pinheiro-brasileiro. Polimorfismo dos ramos.

#### **4 CHAPTER II: ELEMENTAL MICROANALYSIS OF SECONDARY XILEM OF THE *Araucaria angustifolia* STEM**

##### **ABSTRACT**

The stem system of *A. angustifolia* shows dimorphism in the branches. The trunk is orthotropic, while branches and branchlets are plagiotropic. This condition is maintained even when they are propagated vegetatively. Little is known about the physiological causes of this phenomenon and there are no studies in the literature that characterize the elemental composition of each stems. The objective of this study was to characterize the elemental composition in the secondary xylem of the trunk, branches and branchlets of *A. angustifolia*. Samples of trunk, branches and branchlets were collected in individuals of two years old, in the last formed whorl. Transverse sections of 200 µm thickness of trunk, branches and branchlets were fixed, dehydrated and submitted to the critical point. The elemental composition was determined in percentage using Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy coupled to a scanning microscope. The design was completely randomized, using five plants. The spectra were obtained in three distinct points, collected in three regions of each stem. The results were submitted to ANOVA and Tukey test at 5% probability. In general, eight elements were detected: carbon (C), oxygen (O), sodium (Na), silicon (Si), calcium (Ca), phosphorus (P), potassium (K) and sulfur (S). C and O predominated in the composition of the secondary xylem of the three stems, comprising about 98% of the sampled content. In branchlets there was a higher percentage of S and Si. Si was not detected in the trunk. There was no difference between the stems in the percentage of K, P and Na. Ca was detected in a higher percentage in the secondary xylem of the trunk. The results show that there are differences in the elemental composition of the secondary xylem of the three stems, varying accordingly to their function in the plant. There is a predominance of Ca in the trunk, which can be related to the formation of wood, and consequently the trunk support function. Si accumulates in organs with greater transpiration, and was detected only in branchlets, which suggests a function analogous to the leaves.

**Keywords:** Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy. Brazillian pine. Stem polymorphism.

## 4.1 INTRODUÇÃO

*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze é uma conífera nativa da América do Sul, que junto com *A. araucana*, representa a família Araucariaceae no continente (REIS; LADIO; PERONI, 2014). A madeira desta espécie foi muito explorada, principalmente entre os anos de 1930-1970 (DANNER et al., 2012), reduzindo drasticamente a área de ocupação natural da espécie. Atualmente, *A. angustifolia* representa uma fonte de renda adicional, principalmente para produtores extrativistas de regiões economicamente menos favorecidas, através da comercialização da sua semente, o pinhão (CONAB, 2014). A exploração do pinhão é feita atualmente dos remanescentes de floresta nativa que restaram da intensa exploração, o que pode comprometer ainda mais a conservação da espécie (WENDLING, 2015).

Algumas técnicas de propagação vegetativa estão sendo desenvolvidas para *A. angustifolia*, visando à sua conservação e formação de pomares comerciais para a produção de pinhão (ANSELMINI; ZANETTE, 2008; ZANETTE; OLIVEIRA; BIASI, 2011; CONSTANTINO; ZANETTE, 2015; WENDLING; STUEPP; ZUFFELATTO-RIBAS, 2016; CONSTANTINO, 2017). Contudo, o polimorfismo que os ramos possuem naturalmente mantém-se com as técnicas utilizadas. Desta forma, há uma limitação na disponibilidade de propágulos, pois somente propágulos oriundos do tronco são capazes de formar uma copa normal (ZANETTE; OLIVEIRA; BIASI, 2011; CONSTANTINO, 2017). Além desta distinção morfogênica entre os caules, atribui-se ao tronco a função de sustentação, e aos ramos e grimpas a de reprodução (ZANETTE et al., 2017).

Sabe-se pouco a respeito da regulação do polimorfismo dos ramos em *A. angustifolia*, e na literatura são escassos os trabalhos que tratam de análises de composição química, fisiológica ou de variação de composição elementar, que caracterize cada um destes caules. Recentemente, observou-se uma variação no perfil e no conteúdo de aminoácidos-livres, entre tronco, ramo e grimpas, o que evidencia o papel diferenciado desempenhado por cada um, onde o tronco possui uma função estrutural e de sustentação, e as grimpas uma função mais relacionada à fotossíntese (HACKBARTH et al., 2017).

A composição elementar dos tecidos vegetais tem sido obtida por meio de técnicas avançadas de microscopia e espectroscopia (DINH; VU; MULLIGAN; NGUYEN, 2015; ENSIKAT; GEISLER; WEIGEND, 2016; BARBOSA et al., 2017). Na avaliação da acumulação elementar, estudos têm concentrado esforços para entender a distribuição elementar em diferentes células vegetais (CONN; GILLIHAM, 2010) e o sequestro de elementos em cristais (HE et al., 2014). Nesse sentido, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) combinada com espectroscopia por dispersão de energia (EDS) tem sido utilizada de forma eficiente na microanálise de elementos essenciais e elementos potencialmente tóxicos em tecido vegetal (SILVA; AGUIAR-DIAS; MENDONÇA, 2014). Em *A. angustifolia* um estudo avaliou a acumulação elementar nas acículas por EDS em plantas cultivadas em experimento de adubação (BARBOSA et al., 2017). Porém, estudos envolvendo aspectos biológicos e de acumulação de elementos no caule ainda não foram realizados.

A anatomia da madeira de *A. angustifolia* já foi estudada por diversos pesquisadores e já é bem conhecida (WEHR; TOMAZELLO-FILHO, 2000; MATTOS et al., 2006; SIEGLOCH; MARCHIORI, 2015), mas os estudos concentram-se principalmente nos aspectos relacionados ao tronco principal. Em comparação às angiospermas, a madeira das gimnospermas apresenta constituição anatômica mais simples, caracterizada por traqueídes e raios parenquimáticos (SIEGLOCH; MARCHIORI, 2015). Estudos que comparam e descrevem a anatomia do tronco, ramo e grimpá são inexistentes.

Haja vista as diferenças morfogênicas marcantes do sistema caulinar de *A. angustifolia*, o que certamente se reflete em funções diferenciadas desempenhadas por cada um destes, o objetivo do presente trabalho foi verificar se ocorrem diferenças entre o perfil da composição elementar no xilema secundário entre tronco, ramo e grimpá, por meio de análises de EDS, aliado a técnicas de MEV e microscopia de luz.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os indivíduos de *A. angustifolia* utilizados neste trabalho foram provenientes de mudas de sementes cultivadas no viveiro do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em Curitiba/PR (25º

25° de latitude Sul e 49° 16" de longitude Oeste, altitude 911 m), em vasos de 20 L contendo solo e substrato, em condições homogêneas. Foram coletados segmentos caulinares do tronco, ramo e grimpia do último verticilo formado, logo abaixo do ápice caulinar, de cinco indivíduos de aproximadamente dois anos de idade, com remoção das acículas de todas as amostras coletadas.

As análises anatômicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia e Biomecânica Vegetal (LABV) do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em Curitiba/PR. As amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato de potássio 0,1 M e pH 7,2 (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964) por 48 h. Posteriormente as amostras foram lavadas no mesmo tampão por três vezes e desidratadas em série etílica crescente (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 95%-3x), infiltradas em hidroxi-metil-metacrilato (Leica Historesin<sup>®</sup>) e emblocadas nesta mesma resina, conforme recomenda o fabricante. Secções transversais de 9-10 µm de espessura foram obtidas com auxílio de micrótomo de rotação Leica<sup>®</sup> RM 2145. O material foi corado com solução de azul de toluidina 0,05% e montado entre lâmina e lamínula com verniz vitral. As imagens microscópicas foram realizadas em microscópio óptico Olympus BX-41 com câmera digital Olympus DC030 acoplada.

A composição elementar dos caules foi descrita em percentual obtido através de Espectroscopia por Dispersão de Energia (EDS), no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR. As amostras foram lavadas em água deionizada e as seções de 200 µm dos caules foram cortadas em micrótomo de deslize (modelo Spencer AO n. 860). As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,2 (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964) por 48 h. Posteriormente as amostras foram lavadas no mesmo tampão por três vezes e desidratadas em série etílica crescente (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 95%). Após a desidratação foi realizado o ponto crítico com CO<sub>2</sub> líquido. Em seguida, as amostras foram montadas em suportes (stubs) de alumínio recoberto com fita dupla-face de cobre.

As microanálises foram realizadas utilizando microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Vega3 LMU, Tescan) com EDS acoplado (X-Max<sup>N</sup> 80 mm<sup>2</sup>, Oxford). Para a análise de EDS foram selecionados três espectros no xilema secundário (próximo à medula, região intermediária à medula e ao câmbio e próximo

ao câmbio), em três regiões distintas de cada amostra (FIGURA 1.I). As microanálises por EDS foram realizadas com voltagem acelerada de 15 kV e em tempo de 120 s por espectro. Em geral, foram detectados no máximo oito elementos (carbono, oxigênio, sódio, silício, fósforo, enxofre, potássio, cálcio). O equipamento utilizado não é capaz de detectar todos os elementos, ficando excluído, por exemplo, o nitrogênio e o hidrogênio, porém tem sensibilidade para a grande maioria.

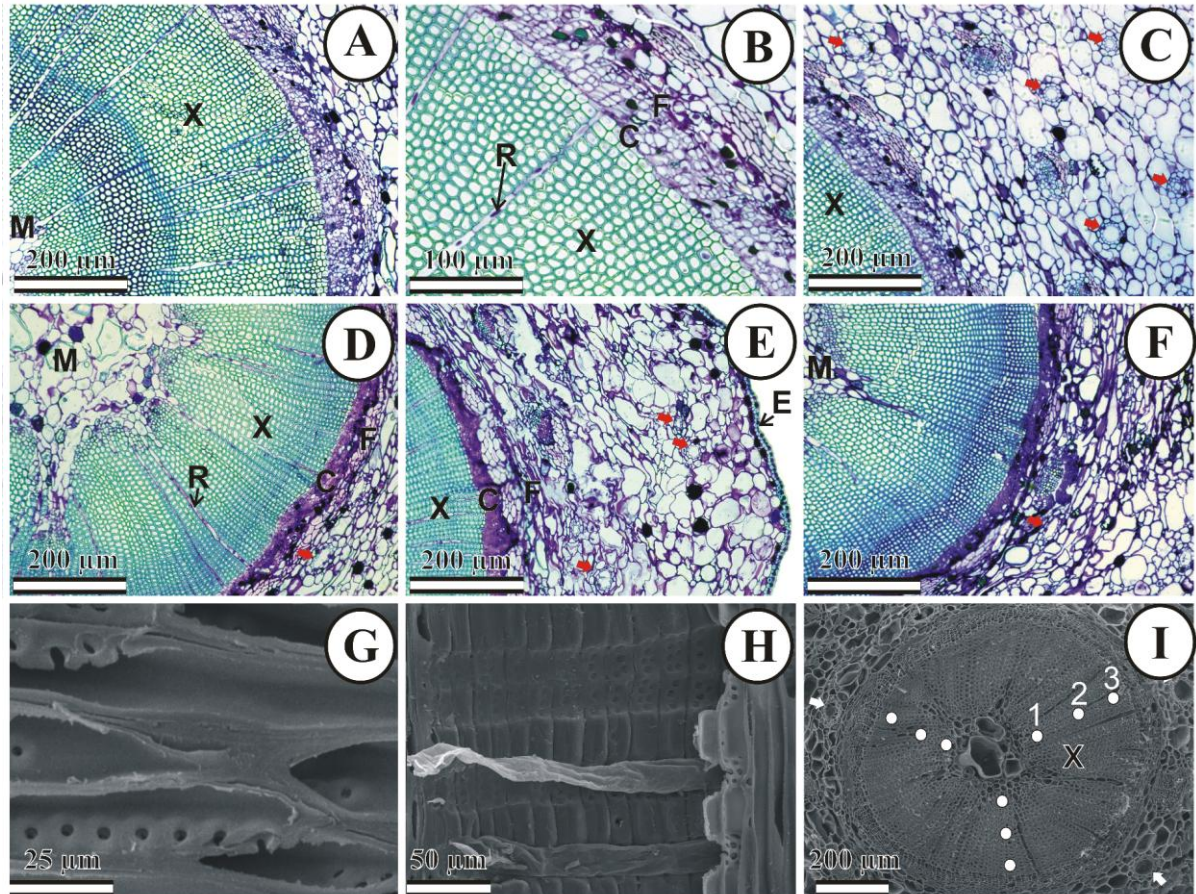
Os dados obtidos foram analisados em delineamento inteiramente casualizado, submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Para cada elemento foram ajustados modelos mistos de regressão linear, considerando duas covariáveis: caule e espectro, e sua interação. O modelo inicial usado neste estudo pode ser descrito como:  $y_{ijk} = \mu + C_i + E_j + C_i \cdot E_j + \gamma_{ik} + \epsilon_{ijk}$ , em que  $i$  indexa o caule,  $j$  indexa o espectro e  $k$  indexa a repetição.  $\gamma$  é o efeito aleatório. As análises estatísticas foram realizadas com o software R.

#### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O caule de *A. angustifolia* é cilíndrico. Anatomicamente a estrutura e organização dos tecidos do tronco, ramo e grimpá de *A. angustifolia* são semelhantes (FIGURA 01). A epiderme é unisseriada e contínua. O córtex é parenquimático, constituído por células isodiamétricas com paredes delgadas e primárias e canais resiníferos. No caule em crescimento secundário observa-se o cilindro vascular, composto externamente pelo floema secundário, e xilema secundário internamente. A estrutura secundária inicia-se logo abaixo do ápice caulinar. O xilema secundário é composto por traqueídes, com pontuações areoladas hexagonais e arranjo alterno. Traqueídes radiais estão ausentes bem como canais resiníferos. Os raios parenquimáticos são homocelulares, unisseriados e raramente bisseriados. Anéis de crescimento estão presentes, caracterizados por diferenças na espessura da parede das traqueídes, com transição gradual entre o lenho inicial e tardio. A medula é ampla e constituída por células parenquimáticas.



FIGURA 01. SECÇÕES TRANSVERSAIS DO TRONCO (A-C), RAMO (D-E) E GRIMPA (F-G) DE *A. angustifolia*. AS IMAGENS FORAM OBTIDAS EM MICROSCOPIA DE LUZ (A-F) E MEV (G-I). CANAIS RESINÍFEROS (SETAS VERMELHAS) ESTÃO PRESENTES NO CÓRTEX. NOTA-SE NO XILEMA SECUNDÁRIO (X) A PRESENÇA DE ANÉIS DE CRESCIMENTO, DEMARCADOS POR TRAQUEÍDES COM PAREDES MAIS ESPESSAS NO LENHO TARDIO E RAIOS UNISSERIADOS (R). PONTOAÇÕES AREOLADAS DAS TRAQUEÍDES (G). SECÇÃO RADIAL MOSTRANDO OS RAIOS (H). LOCAIS (PONTOS BRANCOS) EM QUE FORAM OBTIDOS OS ESPECTROS PARA A ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO ELEMENTAR POR EDS (I).



FONTE: A autora (2018).

A composição elementar do xilema secundário do tronco, ramo e grimpá da *A. angustifolia* está demonstrada na Tabela 01. Os elementos encontrados em maior quantidade no xilema dos três caules avaliados foram o carbono e o oxigênio, constituindo juntos mais de 98% da composição elementar das amostras. Isto era esperado, já que estes elementos compõem majoritariamente os compostos orgânicos dos seres vivos. O carbono, oxigênio e hidrogênio são obtidos pela planta primariamente da água ou dióxido de carbono, não sendo considerados nutrientes minerais (TAIZ; ZEIGER, 2009). Não foram observadas diferenças significativas no percentual de sódio, fósforo e potássio avaliados no xilema secundário dos três caules.

TABELA 01 – COMPOSIÇÃO ELEMENTAR (%) DE CARBONO (C), OXIGÊNIO (O), SÓDIO (Na), CÁLCIO (Ca), FÓSFORO (P), ENXOFRE (S), POTÁSSIO (K) E SILÍCIO (Si) DO XILEMA SECUNDÁRIO DO TRONCO, RAMO E GRIMPA DA *A. angustifolia* DETERMINADO ATRAVÉS DE MICROANÁLISE DE RAIO-X POR EDS.

	<b>C</b>	<b>O</b>	<b>Na</b>	<b>Ca</b>
% dos Elementos $\pm$ Desvio Padrão				
<b>Tronco</b>	59,36 $\pm$ 3,17 b	39,26 $\pm$ 3,06 a	0,42 $\pm$ 0,09 a	0,55 $\pm$ 0,30 a
<b>Ramo</b>	60,29 $\pm$ 2,67 b	38,85 $\pm$ 2,61 a	0,41 $\pm$ 0,09 a	0,22 $\pm$ 0,11 b
<b>Grimpa</b>	62,05 $\pm$ 2,52 a	36,87 $\pm$ 2,38 b	0,46 $\pm$ 0,18 a	0,30 $\pm$ 0,08 b
	<b>P</b>	<b>S</b>	<b>K</b>	<b>Si</b>
% dos Elementos $\pm$ Desvio Padrão				
<b>Tronco</b>	0,18 $\pm$ 0,01 a	0,13 $\pm$ 0,04 ab	0,10 $\pm$ 0 a	-
<b>Ramo</b>	0,12 $\pm$ 0,60 a	0,10 $\pm$ 0,02 b	0,10 $\pm$ 0 a	0,12 $\pm$ 0,05 b
<b>Grimpa</b>	0,18 $\pm$ 0,20 a	0,14 $\pm$ 0,09 a	0,10 $\pm$ 0 a	0,60 $\pm$ 0,14 a

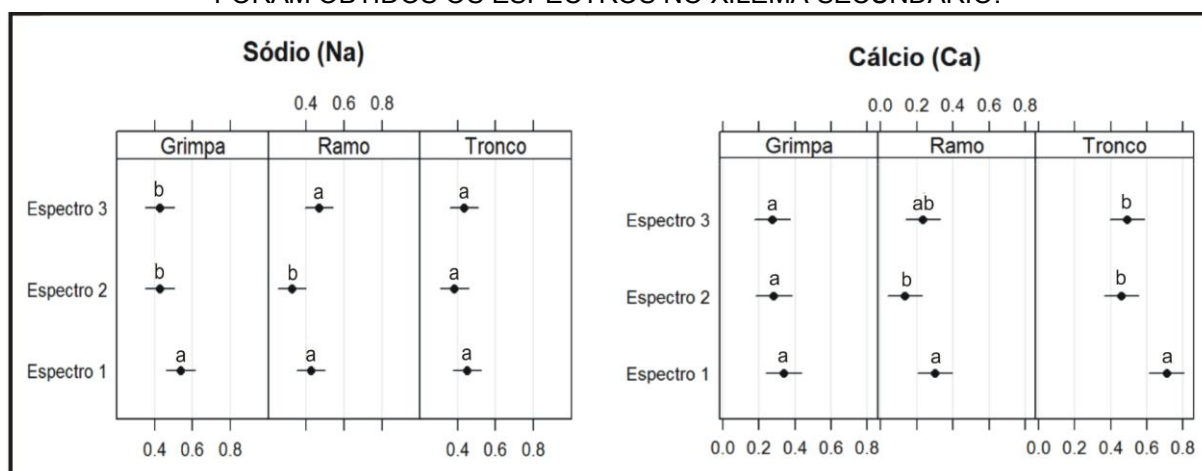
MÉDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DIFERENTES NA COLUNA DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE TUKEY ( $p < 0,05$ ).

FONTE: A autora (2018).

Para os elementos carbono, oxigênio e silício a interação entre caule e espectro não foi significativa, assim como não se observou diferenças significativas entre os espectros (TABELA 01). Ou seja, a distribuição destes elementos no xilema secundário de *A. angustifolia* é homogênea. Contudo, foram observadas diferenças entre caules. Para os elementos fósforo e potássio não foram observadas diferenças entre caules nem entre espectros, assim como não houve interação. Para os elementos sódio e cálcio a interação entre caule e espectro foi estatisticamente significativa (FIGURA 02). O sódio acumulou-se ligeiramente na região do xilema secundário mais próxima à medula (espectro 1) na grimpá, e também na região mais próxima ao câmbio (espectro 3) no ramo. No tronco, não houve diferença entre os espectros para o elemento sódio.

Para o elemento cálcio não houve diferença entre os espectros obtidos na grimpá. Contudo, no ramo observou-se uma distribuição de cálcio semelhante ao observado para o sódio (FIGURA 02). Este elemento apresentou um leve incremento próximo à medula (espectro 1), que diferiu estatisticamente do percentual verificado na região intermediária do xilema secundário (espectro 2). No tronco o cálcio acumula-se em maior percentual na região do xilema secundário próxima à medula.

FIGURA 02. COMPOSIÇÃO DE SÓDIO E CÁLCIO (%) DO TRONCO, RAMO, E GRIMPA DA *A. angustifolia* OBTIDA POR EDS. MÉDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA PARA ESTES ELEMENTOS EM RELAÇÃO AOS LOCAIS EM QUE FORAM OBTIDOS OS ESPECTROS NO XILEMA SECUNDÁRIO.



FONTE: A autora (2018).

O cálcio foi quantificado em maior percentual no xilema secundário do tronco, que também apresentou juntamente com o ramo, maior percentual de oxigênio. O cálcio desempenha um papel importante na síntese das paredes celulares, particularmente na lamela média, onde as cadeias de pectina estão ligadas entre si por este elemento (TAIZ; ZAIGER, 2009). Também é necessário durante a divisão celular e como mensageiro secundário para numerosas respostas aos sinais ambientais e hormonais (WHITE; BROADLEY, 2003). Além disso, o cálcio intracelular atua como um estabilizador de membrana, tendo também um efeito protetor contra o influxo passivo de íons. O cálcio é, ainda, essencial para processos básicos de formação da madeira (FROMM, 2010). Quando álamos (*P. tremula* L. X *P. tremuloides* Mix) foram cultivados hidroponicamente sob deficiência de cálcio, uma redução no incremento da formação de madeira, tamanho de vasos e comprimento das fibras foi observado por análise microscópica (LAUTNER et al., 2007). Lautner et al. (2007) apontam que o cálcio exerce efeito direto na xilogênese em álamo.

Na formação da parede celular, o cálcio desempenha papel fundamental na rigidez estrutural da parede (HEPLER, 2005). O cálcio se deposita nas camadas da parede celular durante a diferenciação do xilema, tendo uma função importante na rigidez da parede secundária (BRETT; WALDRON, 1996). No processo de lignificação do xilema, Westermarck (1982) sugeriu que o cálcio estava envolvido na polimerização de lignina dentro da parede celular.

Wimmer e Lucas (1997) confirmaram essa sugestão mostrando que o baixo teor de cálcio levou à menor proporção de lignina na madeira de *Abies*, induzindo mudanças na dureza e elasticidade da madeira. Assim, uma relação estreita entre o teor de cálcio, a concentração de lignina e as propriedades mecânicas da madeira parece ser óbvia (WIMMER et al., 1997). Desta forma, o maior percentual de cálcio no xilema secundário do tronco da *A. angustifolia* pode estar relacionado à função estrutural de sustentação e a maior taxa de crescimento secundário deste caule, em comparação ao ramo e a grimpá, que apresentam crescimento reduzido em diâmetro e tempo de vida limitado (ZANETTE et al., 2017).

O silício foi detectado na grimpá e no ramo, ficando ausente no tronco. A análise de EDS apontou um maior percentual de silício e carbono no xilema secundário da grimpá em relação ao quantificado no ramo, bem como maior percentual de enxofre (TABELA 01). O conteúdo de silício pode variar em diferentes órgãos de uma mesma planta. Em bambu, a concentração de silício foi mais elevada nos colmos e nos galhos, em comparação ao conteúdo observado nas folhas (TORRES et al., 2009). Em *Vaccinium corymbosus*, folhas velhas acumularam maior quantidade de silício do que folhas jovens (MORIKAWA; SAIGUSA, 2004). Os elementos traqueais do xilema são os responsáveis pelo transporte do elemento na planta, e sua distribuição é diretamente dependente das taxas de transpiração dos órgãos (MENEGALE; CASTRO; MANCUSO, 2015).

Nas plantas, o enxofre incorpora-se naturalmente em proteínas (VITTI et al., 2006). O enxofre é encontrado em dois aminoácidos, cisteína e principalmente em metionina, além de ser constituinte de várias coenzimas e vitaminas (TAIZ; ZAIGER, 2009). Em um estudo que comparou a composição de aminoácidos-livres presentes nos três caules de *A. angustifolia*, a grimpá apresentou um conteúdo de metionina intermediário em relação ao quantificado no tronco e ramo (HACKBARTH et al., 2017). Assim como relatado para o silício, o enxofre é transportado da raiz para a parte aérea através do xilema, na corrente transpiratória, sendo o movimento inverso, ou seja, da parte aérea para as raízes através do floema, muito pequeno (MALAVOLTA, 2006).

A transpiração ocorre em maior intensidade em folhas. Na família Araucariaceae, quando presentes, os ramos secundários ou “grimpas”, no caso da *A. angustifolia*, são considerados os órgãos predominantes da fotossíntese

(VEILLON, 1981). Poucas espécies da família Araucariaceae apresentam abscisão individual de acículas, sendo mais comum a abscisão dos ramos, o que torna isto uma característica comum da família (BURROWS; MEAGHER; HEADY, 2007). O maior conteúdo de silício e enxofre presentes no xilema secundário de grimpas observado neste trabalho reforça que este caule desempenha uma função semelhante às folhas de angiospermas.

#### **4.4 CONCLUSÕES**

Embora a composição e organização estrutural dos caules de *A. angustifolia* sejam semelhantes, a composição elementar do xilema secundário difere entre tronco, ramo e grimpas, em relação ao percentual de silício, enxofre, cálcio, carbono e oxigênio, o que pode ser relacionado às funções diferenciadas desempenhadas por cada um destes. As diferenças na composição elementar reforçam o papel do tronco como órgão principal de sustentação da planta, e o das grimpas como análogos às folhas.

## REFERÊNCIAS

- BARBOSA, J. Z.; CONSTANTINO, V.; ZANETTE, F.; MOTTA, A. C. V.; PRIOR, A. S. Soil fertility affects elemental distribution in needles of the conifer *Araucaria angustifolia*: a microanalytical study. **Cerne**, v. 2, n. 3, p. 257-266, 2017. doi: 10.1590/0104776020172302313.
- BRETT, C.; WALDRON, K. **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. 2 ed. London, UK: Chapman & Hall, 1996.
- BURROWS, G. E.; MEAGHER, P. F.; HEADY, R. D. An anatomical assessment of branch abscission and branch-base hydraulic architecture in the endangered *Wollemia nobilis*. **Annals of Botany**, v. 99, n. 4, p. 609-623, 2007. doi: 10.1093/aob/mcm003.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Pinhão (semente)**. Conjuntura especial, set. 2014, 21 p. Disponível em: <<https://goo.gl/HkbacM>>. Acesso em: 16/05/2017.
- CONN, S.; GILLIHAM, M. Comparative physiology of elemental distributions in plants. **Annals of Botany**, v. 105, n. 7, p. 1081-1102, 2010. doi: 10.1093/aob/mcq027.
- CONSTANTINO, V.; ZANETTE, F. Produção de borbulhas ortotrópicas para enxertia de *Araucaria angustifolia*. **Acta Biologica Paranaense**, Curitiba, v. 44, n. 4-5, p. 49-55, 2015. doi: 10.5380/abpr.v44i1-4.47598.
- DINH, N.; VU, D. T.; MULLIGAN, D.; NGUYEN, A. V. Accumulation and distribution of zinc in the leaves and roots of the hyperaccumulator *Nocca caerulescens*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 110, p. 85-95, 2015. doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.10.001.
- ENSIKAT, H. J.; GEISLER, T.; WEIGEND, M. A first report of hydroxylated apatite as structural biomineral in Loasaceae - plants' teeth against herbivores. **Scientific Reports**, v. 19, n. 6, (26073), 2016. doi: 10.1038/srep26073.
- FROMM, J. Wood formation of trees in relation to potassium and calcium nutrition. **Tree Physiology**, v. 30, n. 9, p. 1140-1147, 2010. doi: 10.1093/treephys/tpq024.
- HACKBARTH, C.; SOFFIATTI, P.; ZANETTE, F.; FLOH, E. I. S.; MACEDO, A. F.; LAUREANO, H. A. Free amino acid content in trunk, branches and branchlets of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Journal of Forestry Research**, (online), 2017. doi: 10.1007/s11676-017-0581-6.
- HE, H.; VENEKLAAS, E. J.; KUO, J.; LAMBERS, H. Physiological and ecological significance of biomineralization in plants. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 3, p. 166-174, 2014. doi: 10.1016/j.tplants.2013.11.002.

HEPLER, P. K. Calcium: A Central Regulator of Plant Growth and Development. **The Plant Cell**, v. 17, p. 2142-21-55, 2005. doi: 10.1105/tpc.105.032508.

LAUTNER, S.; EHLTING, B.; WINDEISEN, E.; RENNENBERG, H.; MATYSSEK, R.; FROMM, J. Calcium nutrition has a significant influence on wood formation of poplar. **New Phytology**, v. 173, n. 4, p. 743-752, 2007. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.01972.x.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Ceres, 2006, 638 p.

MATTOS, P. P.; BORTOLI, C.; MARCHESAN, C.; ROSOT, N. C. **Caracterização Física, Química e Anatômica da Madeira de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze**. Embrapa Florestas: Comunicado Técnico 160, Colombo/PR, 2006. Disponível em: <<https://goo.gl/WrU1WL>> Acesso em: 09/02/2018.

MENEGALE, M. L. C.; CASTRO, G. S. A.; MANCUSO, M. A. C. Silício: interação com o sistema solo-planta. **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v. 4, n. especial, p. 435-454, 2015. Disponível em: <<https://goo.gl/XDSxn2>> Acesso em: 22/03/2018.

MORIKAWA, C. K.; SAIGUSA, M. Mineral compositions and accumulation of silicon in tissues of blueberry (*Vaccinium corymbosus* cv. Bluecrop) cuttings. **Plant and Soil**, v. 258, n. 1, p. 1-8, 2004. doi: 10.1023/B:PLSO.0000016489.69114.55.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by 78toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964. doi: 10.1007/BF01248568.

R CORE TEAM. R: **A language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing. Viena, Áustria, 2016.

REIS, M. S.; LADIO, A.; PERONI, N. Landscapes with *Araucaria* in South America: evidence for a cultural dimension. **Ecology and Society**, v. 19, n. 2, artigo 43, 2014. doi: 10.5751/ES-06163-190243.

SIEGLOCH, A. M.; MARCHIORI, J. N. C. Anatomia da madeira de treze espécies de coníferas. **Ciência da Madeira**, v. 6, n. 3, p. 149-165, 2015. doi: 10.12953/2177-6830/rcm.v6n3p149-165.

SILVA, R. J. F., AGUIAR-DIAS, A. C. A., MENDONÇA, M. S. Rosetas e concrecências cristalinas silicificadas em *Piper* (Piperaceae): registros inéditos de macropadrões. **Acta Amazonica**, v. 44, n. 4, p. 435-446, 2014. doi: 10.1590/1809-4392201305553.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 4. ed. 2009, 848 p.



TORRES, J. E. L.; SERPA, P. R. K.; MESQUITA, A. R. S.; COELHO, I. A. M.; ALMEIDA, C. C. S.; BEZERRA NETO, E. Análise comparativa do teor de silício em diferentes órgãos vegetais do bambu. In: **IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão**, UFRPE, Recife, 2009. Disponível em: <<http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R1429-2.pdf>>. Acesso em: 06/06/2017.

VITTI, G. C.; LIMA, E.; CICARONE, F. Cálcio, magnésio e enxofre. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006.

WENDLING, I. **Tecnologia de enxertia de *Araucaria angustifolia* para produção precoce de pinhões, com plantas de porte reduzido**. Colombo: Embrapa Florestas, Comunicado técnico 351, maio, 2015. Disponível em: <<https://goo.gl/v6B5JW>> Acesso em: 01/02/2018.

WENDLING, I.; STUEPP, C. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. *Araucaria angustifolia* grafting: techniques, environments and origin of propagation material. **Bosque**, v. 37, n. 2, p. 285-293, 2016. doi: 10.4067/S0717-92002016000200007.

WESTERMARK, U. Calcium promoted phenolic coupling by superoxide radical – a possible lignifications reaction in wood. **Wood Science Technology**, v. 16, n. 1, p. 71-78, 1982. doi: 10.1007/BF00351376.

WEHR, N. J.; TOMAZELLO-FILHO, M. Caracterização dos anéis de crescimento de árvores de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, através de microdensitometria de raios-X. **Scientia Florestalis**, n. 58, p. 161-170, 2000. Disponível em: <https://goo.gl/q1suaZ> Acesso em: 09/02/2018.

WIMMER, R.; LUCAS, B. N. Comparing mechanical properties of secondary wall and cell corner middle lamella in spruce wood. **Iawa Journal**, v. 18, n. 1, p. 77–78, 1997. doi: 10.1163/22941932-90001463.

WIMMER, R.; LUCAS, B. N.; TSUI, T. I.; OLIVER, W. C. Longitudinal hardness and Young's modulus of spruce tracheid secondary walls using indentation technique. **Wood Science Technology**, v. 31, n. 2, p. 131-141, 1997. doi: 10.1007/BF00705928.

ZANETTE, F.; DANNER, M. A.; CONSTANTINO, V.; WENDLING, I. Particularidades e biologia reprodutiva de *Araucaria angustifolia*. In: WENDLING, I.; ZANETTE, F. (eds) **Araucária: particularidades, propagação e manejo de plantios**. Embrapa, Brasília, 2017, p.15–39.

ZANETTE, F.; OLIVEIRA, L. S.; BIASI, L. A. Grafting of *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze through de four seasons of the year. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 4, p. 1364–1370, 2011. doi: 10.1590/S0100-29452011000400040.



## 5 CAPÍTULO III: CONTEÚDO DE AMINOÁCIDOS-LIVRES NO TRONCO E RAMOS DA *Araucaria angustifolia*<sup>1</sup>

### RESUMO

*Araucaria angustifolia* apresenta polimorfismo em sua estrutura caulinar, sendo o tronco ortotrópico e o ramo e a grimpia plagiotrópicos. Estes caules apresentam comportamento diferenciado quando utilizados na propagação vegetativa, e somente segmentos do tronco podem formar uma planta completa. Os mecanismos fisiológicos e bioquímicos que caracterizam estes caules ainda são pouco conhecidos. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o perfil dos aminoácidos-livres presentes no tronco, ramo e grimpia de *A. angustifolia*. Segmentos caulinares de cinco centímetros foram removidos do tronco, ramo e grimpia de indivíduos com dois anos de idade, abaixo do ápice caulinar. As acículas foram retiradas e o material foi congelado e liofilizado. Vinte e um aminoácidos-livres foram extraídos com etanol 80%, as determinações foram feitas através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g/g}$  de massa fresca (MF). O tronco e o ramo apresentaram o maior conteúdo de aminoácidos totais, que foi respectivamente de  $112,23 \pm 20,57 \mu\text{g/g}$  de MF e  $111,97 \pm 27,78 \mu\text{g/g}$  de MF. Os aminoácidos - glutamina, aspartato e o ácido  $\gamma$ -aminobutírico + tirosina - destacaram-se nos três tipos de caule. No tronco também foi detectado um maior teor dos aminoácidos asparagina e triptofano. O ácido glutâmico e glutamina foram quantificados em maior quantidade no ramo. A grimpia apresentou baixíssimo conteúdo de aminoácidos totais ( $30,79 \pm 4,19 \mu\text{g/g}$  de MF), sendo que a asparagina foi o único aminoácido não detectado. Sendo assim, constatou-se que o perfil dos aminoácidos-livres difere entre o tronco, ramo e grimpia, o que demonstra que o caule não forma um sistema único, apresentando diferenças bioquímicas entre si, com cada um apresentando uma diferente função na planta.

Palavras-chave: Mecanismos fisiológicos. Pinheiro-brasileiro. Polimorfismo do caule.

---

<sup>1</sup> Publicado como artigo no periódico Journal of Forestry Research. doi: 10.1007/s11676-017-0581-6

## 5 CHAPTER III: FREE AMINO ACID CONTENT IN TRUNK AND BRANCHES OF *Araucaria angustifolia*

### ABSTRACT

*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze exhibits polymorphism in its stem structure, where the trunk is orthotropic and branches and branchlets (primary and secondary branches) are plagiotropic. These stems exhibit different behavior when used for vegetative propagation, and only segments of trunk can form a complete plant. The physiological and biochemical mechanisms that characterize these stems are still little known. The aim of this study was to describe the free amino acid profiles in trunks, branches, and branchlets of *A. angustifolia*. Segments of five centimeters in length were excised from young individuals below the stem apex. The needles were removed and samples were frozen and lyophilized. The determinations were made by high-performance liquid chromatography (HPLC), and the results were expressed as  $\mu\text{g/g}$  fresh weight (FW). The trunks and branches had the highest content of total amino acids, which were  $112.23 \pm 20.57 \mu\text{g/g FW}$  and  $111.97 \pm 27.78 \mu\text{g/g FW}$ , respectively. The amino acids - glutamine, aspartate and  $\gamma$ -aminobutyric acid and tyrosine - were noticeably higher in the three types of stems. In the trunk, a higher amount of asparagine and tryptophan, was also detected. Glutamic acid and glutamine were found in higher quantities in the branches. The branchlets had very low total amino acid content ( $30.79 \pm 4.19 \mu\text{g/g FW}$ ), wherein asparagine is the only amino acid not detected. Thus, it was observed that the profile of the free amino acid differs among trunks, branches, and branchlets in *A. angustifolia*, indicating that they perform different functions.

Keywords: Physiological mechanisms. Brazilian Pine. Stem's polymorphism.

## 5.1 INTRODUÇÃO

A *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae), conhecida popularmente como araucária, pinheiro-brasileiro ou pinheiro-do-Paraná, é a única conífera nativa do Brasil com importância econômica (ELBL et al., 2014). Além da madeira de excelente qualidade, tanto para construções quanto para fabricação de papel, o pinhão, que é a semente da araucária, é utilizado tanto na alimentação humana quanto pela fauna silvestre, e possui um excelente valor nutricional (STEINER et al., 2008). A exploração comercial do pinhão é feita atualmente a partir de povoamentos naturais, mas algumas pesquisas vêm sendo desenvolvidas visando propagar vegetativamente a espécie para a formação de pomares clonais, principalmente através da enxertia (WENDLING, 2011; ZANETTE; OLIVEIRA; BIASI, 2011). Contudo, há limitações para a utilização da propagação vegetativa, especialmente no que se refere ao uso de ramos plagiotrópicos, que são os que predominam na arquitetura da planta (KAGEYAMA; FERREIRA, 1975).

Os ramos da *A. angustifolia* apresentam polimorfismo, e de acordo com o seu padrão de crescimento eles podem ser classificados como ortotrópicos ou plagiotrópicos (ZANETTE; OLIVEIRA; BIASI, 2011). Os ramos ortotrópicos crescem em bifurcações ou ápices do tronco, possui diâmetro avantajado e orientação verticalizada (KAGEYAMA; FERREIRA, 1975). Quando há o interesse de formar pomares clonais comerciais, os segmentos ortotrópicos oriundos do tronco são os únicos que podem ser utilizados na propagação vegetativa da *A. angustifolia*, pois somente estes são capazes de formar um indivíduo completo (ZANETTE; OLIVEIRA; BIASI, 2011).

Os ramos plagiotrópicos, por outro lado, exibem crescimento lateral ou horizontal, simetria bilateral e crescimento e tempo de vida limitados (IRITANI; ZANETTE; CISLINSKY, 1992; ZANETTE et al., 2017). Quando utilizados na propagação vegetativa, os ramos plagiotrópicos não formam indivíduos normais porque geralmente mantêm sua forma de crescimento lateral e são incapazes de formar uma copa completa, com a arquitetura característica de *A. angustifolia* (IRITANI; ZANETTE; CISLINSKY, 1992; WENDLING, 2011). Essa característica permanece mesmo se eles são enxertados em uma porta-enxerto ortotrópico (ZANETTE; OLIVEIRA; BIASI, 2011).

O ortotropismo e o plagiotropismo caracterizam as plantas da família Araucariaceae, e esses ramos permanecem como tal, independentemente da orientação ou tratamento que lhes são impostos (HAINES; FOSSARD, 1977). Além disso, a questão do polimorfismo dos ramos vai além do ortotropismo ou plagiotropismo, uma vez que ramos enxertados com desenvolvimento em orientação vertical (ortotrópica) continuaram com a morfologia típica do ramo (CONSTANTINO, 2017).

Outra característica interessante de *A. angustifolia* é que o tronco não produz estruturas reprodutivas. Androstróbilos se desenvolvem na extremidade de grimpas e ginostrobilos normalmente se desenvolvem nas extremidades dos ramos, raramente em grimpas (ZANETTE et al., 2017). Essas características peculiares indicam que estes caules têm funções diferentes na planta.

Os mecanismos que regulam o comportamento destes caules são pouco elucidados. Alguns estudos limitam-se a pesquisar a regulação hormonal, principalmente de auxinas, em ramos ortotrópicos (MUDEY, 2001; VEIERSKOV et al., 2007). Contudo, os ramos destinados a serem permanentemente plagiotrópicos devem ter um sistema de regulação diferente do que o controle do tronco na vertical, e este fenômeno é regulado provavelmente dentro do próprio ramo (McSTEEN; LEYSER, 2005; VEIERSKOV et al., 2007). Em *A. angustifolia* não há estudos caracterizando bioquimicamente e fisiologicamente o comportamento destes caules, mas diversos aspectos fisiológicos, como a regulação hormonal, fatores de transcrição, dentre outras moléculas como os aminoácidos, devem estar envolvidos, e devem ir além do tropismo dos ramos.

Os aminoácidos possuem várias funções importantes em plantas. Além de seu uso durante a biossíntese de proteínas, eles também representam blocos de construção para várias outras vias biossintéticas (HILDEBRANDT et al., 2015) e são fundamentais para o transporte de nitrogênio na planta (CÁNOVAS, et al., 2007; LEA et al., 2006). Apresentam, além do papel estrutural, importância em uma infinidade de reações celulares, influenciando vários processos fisiológicos, tais como o crescimento e o desenvolvimento da planta, controle de pH intracelular, geração de energia metabólica ou poder redox, resistência a estresses tanto abióticos quanto bióticos (FAGARD et al., 2014; GALILI et al., 2014; ZEIER, 2013).

Recentemente tem-se atribuído um papel de sinalização em plantas para diversos aminoácidos (HÄUSLER; LUDEWIG; KRUEGER, 2014).

A função de aminoácidos específicos e sua degradação têm sido extensivamente investigadas em diferentes órgãos das plantas (FAIT et al., 2008; GU et al., 2010; KRÜßEL et al., 2014). Em geral, o conteúdo dos aminoácidos difere fortemente e muda, dependendo do desenvolvimento e estado fisiológico da planta. Em *A. angustifolia* o conteúdo de aminoácidos-livres tem sido avaliado em trabalhos envolvendo a embriogênese zigótica e somática e desenvolvimento da semente (ASTARITA et al., 2003; ASTARITA et al., 2003/4), porém não há estudos que relacionem o conteúdo de aminoácidos-livres no caule.

Este trabalho caracterizou o perfil dos aminoácidos-livres presentes no caule da *A. angustifolia*, a partir de segmentos retirados do tronco, ramo e grimpá, em plantas jovens, com o objetivo de identificar se haviam diferenças fisiológicas entre os mesmos.

## 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biologia Celular de Plantas, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), em São Paulo - SP. As plantas utilizadas neste ensaio foram provenientes de mudas de sementes situadas no Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em Curitiba – PR (25°25" de latitude Sul e 49°16" de longitude Oeste, com altitude média de 934,6 m). As plantas foram cultivadas em vasos de 20 L contendo solo e substrato, em condições homogêneas, com uma planta em cada vaso. As amostras foram coletadas em julho de 2016.

Os segmentos caulinares de cinco centímetros, localizados abaixo do ápice de ramos e grimpas (plagiotrópicos) e do tronco (ortotrópico) de *A. angustifolia*, foram coletados de plantas-matrizes jovens de dois anos de idade, no último verticilo formado. As acículas dos caules foram removidas e as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas (liofilizador Edwards®, com bomba de alto vácuo Savant II e volume de 30 L). Foi feito cálculo para a relação entre massa fresca e massa liofilizada das amostras.

Os aminoácidos-livres foram extraídos utilizando 0,2 g de massa fresca. As amostras foram maceradas em 6 mL de etanol 80%, e em seguida foram concentradas em *speed vac* a 45 °C até a eliminação do etanol. As amostras tiveram seu volume ajustado para 2 mL com água e foram centrifugadas a 20.000 *g*, por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi purificado, antes da análise cromatográfica, em mini-coluna C18 (Sep-pak Waters®), com 12 mL de metanol, e posteriormente as amostras foram concentradas novamente em *speed vac* a 45 °C, até a eliminação do metanol. O volume dos extratos de aminoácidos foi ajustado para 1,5 mL. As amostras sofreram derivatização pré-coluna com solução OPA-Borato (140 mg de o-ftaldialdeído, 2,8 mL de metanol 100%, 18,2 mL de tampão borato 400 mM pH 9,5 e 166,2 µL de β-mercaptoetanol). Alíquotas de 20 µL de amostras derivatizadas foram injetadas.

A identificação e quantificação dos aminoácidos-livres foi feita de acordo com Astarita et al. (2004) e Wu e Meininger (2008). Os aminoácidos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE/F) (Shimadzu®) empregando uma coluna Supelcosil LC-18 de fase reversa com 25 cm x 4,6 mm, revestimento de sílica gel e tamanho de partícula de 5 µm (Sigma/Supelco®). O conteúdo dos aminoácidos foi expresso em µg/g de massa fresca (MF). Os reagentes utilizados para fase móvel foram obtidos da Merck® Lichrosolv.

O eluente A foi constituído por acetato de sódio triidratado (100 mM), 5 mL/L de tetrahydrofurano, 60 mL/L de metanol e água deionizada até o volume final de 1 L. O pH 7,2 foi ajustado com 48 uL/L de HCL (6 N). O eluente B foi constituído de metanol 100%. O programa de eluição de metanol 100% em relação ao outro eluente definiu o gradiente de corrida, a uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min. Nos primeiros 15 min a concentração de B permaneceu em 14%, automaticamente o gradiente foi sendo alterado da seguinte forma: de 14 a 30% entre 15 e 20 min, de 30 a 35% entre 20 e 24 min, de 35 a 47% entre 24 e 26 min, de 47 a 50% entre 26 e 34 min, de 50 a 70% entre 34 e 38 min, de 70 a 100% entre 38 a 40 min, mantendo-se em 100% até 42 min para limpeza da coluna, e retornando a 14% até 49 min para estabilização e início de nova corrida. A temperatura do forno da coluna foi mantida a 40 °C.

O detector de fluorescência foi ajustado para excitação em 250 nm e emissão em 480 nm. As áreas e tempos de retenção de cada aminoácido (APÊNDICES 03-05) foram avaliados por comparação com aminoácidos padrão em concentrações conhecidas (APÊNDICE 02): aspartato (ASP), glutamato (GLU), asparagina (ASN), serina (SER), glutamina (GLN), histidina (HIS), glicina (GLY), arginina (ARG), treonina (TRE), alanina (ALA), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) + tirosina (TIR), metionina (MET), triptofano (TRP), valina (VAL), fenilalanina (PHE), isoleucina (ILE), leucina (LEU), ornitina (ORN), lisina (LIS) e citrulina (CIT).

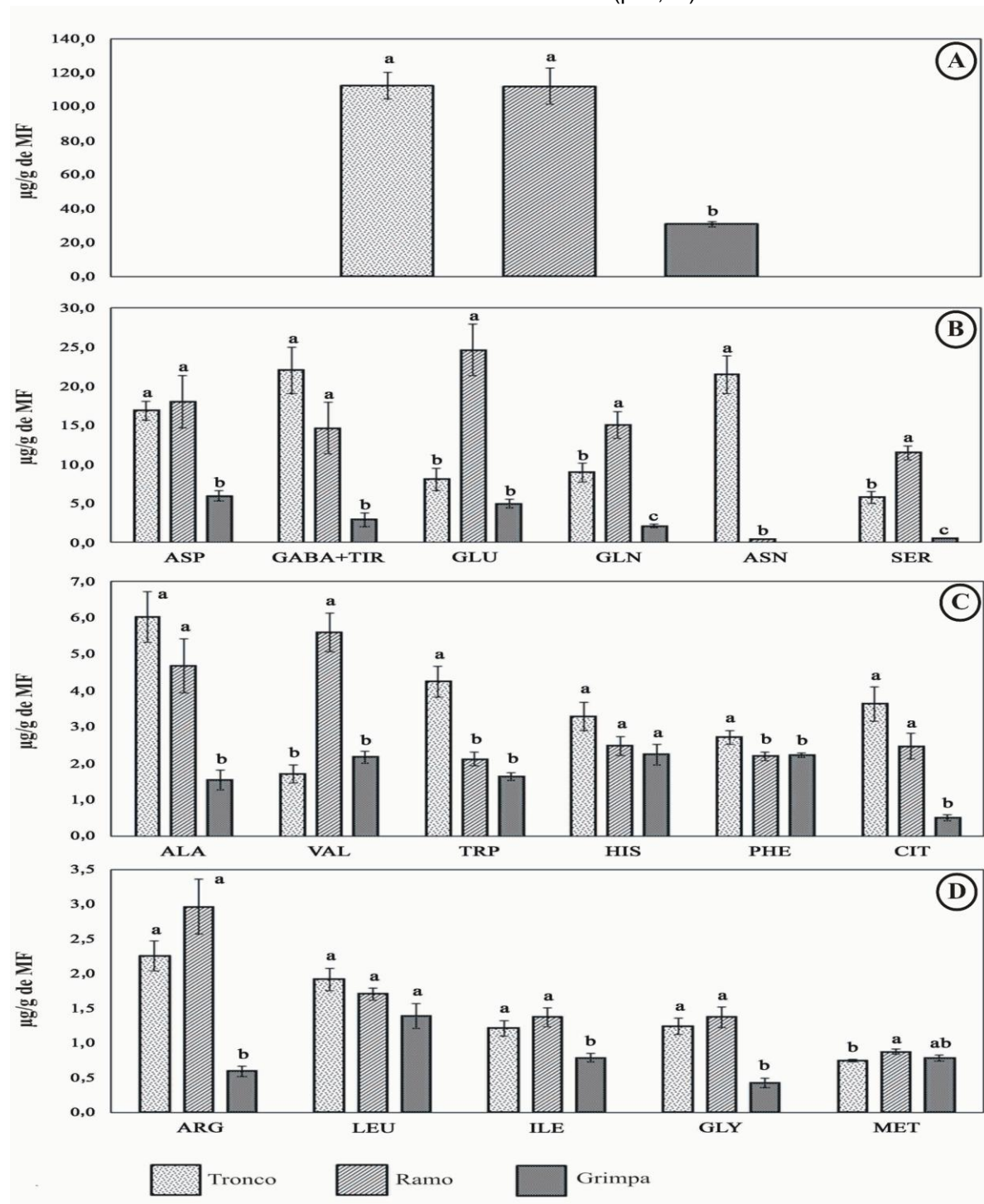
O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com sete repetições para cada caule. Para verificar a existência de diferença significativa no conteúdo dos aminoácidos entre os caules procedeu-se com a Análise de Variância (ANOVA) e posteriormente os dados foram submetidos ao teste de Tukey para a comparação das médias observadas, com nível de significância de 95%, utilizando-se o software R.

### 5.3 RESULTADOS

A composição dos aminoácidos-livres do caule da *A. angustifolia*, avaliada em segmentos do tronco, ramo e grimpia está apresentada na FIGURA 01.A. O tronco e o ramo apresentaram maior conteúdo de aminoácidos totais. O teor médio total de aminoácidos-livres presentes no tronco foi de  $112,23 \pm 20,57$   $\mu\text{g/g}$  de massa fresca, no ramo foi de  $111,97 \pm 27,78$   $\mu\text{g/g}$  de massa fresca e na grimpia foi de  $30,79 \pm 4,19$   $\mu\text{g/g}$  de massa fresca, um valor aproximadamente 73% inferior ao observado no tronco e no ramo. Observou-se diferença significativa entre ao menos um par de caules em dezesseis aminoácidos avaliados (FIGURA 01.B-D). Os aminoácidos - ornitina, treonina e lisina - não foram detectados nos caules analisados.

O teor de asparagina ( $21,51 \pm 6,39$   $\mu\text{g/g}$  de MF) foi maior no tronco, em comparação com o ramo e grimpia (FIGURA 01.B). O conteúdo de triptofano foi maior no tronco ( $4,25 \pm 1,12$   $\mu\text{g/g}$  MF) e ramo ( $2,12 \pm 0,5$   $\mu\text{g/g}$  de MF) (FIGURA 01.C).

FIGURA 01. CONTEÚDO TOTAL DE AMINOÁCIDOS-LIVRES ( $\mu\text{g/g}$  de MF) NO TRONCO, RAMO E GRIMPA DE *A. angustifolia* COM DOIS ANOS DE IDADE (A); CONTEÚDO DE ASPARTATO (ASP), ÁCIDO  $\gamma$ -AMINOBUTÍRICO + TIROSINA (GABA+TIR), GLUTAMATO (GLU), GLUTAMINA (GLN), ASPARAGINA (ASN) E SERINA (SER) NO TRONCO, RAMO E GRIMPA ( $\mu\text{g/g}$  de MF) (B); CONTEÚDO DE ALANINA (ALA), VALINA (VAL), TRIPTOFANO (TRP), HISTIDINA (HIS), FENILALANINA (PHE), CITRULINA (CIT) NO TRONCO, RAMO E GRIMPA ( $\mu\text{g/g}$  de MF) (C); CONTEÚDO DE ARGININA (ARG), LEUCINA (LEU), ISOLEUCINA (ILE), GLICINA (GLY) E METIONINA (MET) NO TRONCO, RAMO E GRIMPA ( $\mu\text{g/g}$  de MF) (D). LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ENTRE OS CAULES. AS LINHAS VERTICAIS INDICAM O ERRO PADRÃO DAS MÉDIAS ( $p < 0,05$ ).



FONTE: A autora (2018).



A proporção de aminoácidos variou de acordo com o tipo de caule avaliado. O aspartato e a glutamina foram proeminentes, predominando nos três tipos de caule (FIGURA 01.B), especialmente no tronco e nos ramos. Apesar da grande quantidade de ácido  $\gamma$ -aminobutírico+tirosina encontrada no presente estudo (FIGURA 01.B), esses dados fornecem apenas informações qualitativas e não quantitativas devido à baixa resolução do pico obtido. Não foi possível quantificar a tirosina sozinha porque foi quantificada em conjunto com ácido  $\gamma$ -aminobutírico. As grimpas possuíam níveis muito baixos de aminoácidos totais (FIGURA 01.A), e a asparagina, embora presente no tronco e em ramos, não foi detectada na grimpá (FIGURA 01.B). Os aminoácidos histidina e fenilalanina foram encontrados em quantidades consistentes entre os três tipos de caule, mas em níveis ligeiramente superiores no tronco (FIGURA 01.C). A asparagina também foi detectada em maior quantidade no tronco, enquanto a glutamina e o ácido glutâmico foram detectados em maior quantidade nos ramos (FIGURA 01.B).

#### 5.4 DISCUSSÃO

O polimorfismo entre ramos não é uma característica única de *Araucariaceae*; tem sido observado em espécies de uma grande variedade de gêneros pertencentes a outras famílias de gimnospermas e angiospermas, como *Gossypium*, *Theobroma*, *Castilla*, *Musa*, *Hedera*, *Coffea* e *Pinus* (CARVALHO; KRUG; MENDES, 1950; OLIVEIRA et al., 2012; FLORES-RENTERÍA et al., 2013). Em *Gossypium* e *Castilla*, esse dimorfismo se manifesta pela ocorrência de ramos vegetativos e floríferos. Por outro lado, em *Araucaria*, *Hedera*, *Theobroma* e *Coffea*, o dimorfismo está relacionado à direção do crescimento, ou seja, crescimento plagiotrópico ou ortotrópico tomado pelos ramos durante o desenvolvimento (CARVALHO; KRUG; MENDES, 1950; OLIVEIRA et al., 2012; ZANETTE et al., 2017). No entanto, em *A. angustifolia* também observamos dimorfismo em relação aos ramos vegetativos e reprodutivos. Isto é devido à indução de um meristema vegetativo em um meristema reprodutivo que ocorre predominantemente em ramos e muito raramente em grimpas e nunca no tronco (ZANETTE et al., 2017).

A função estrutural dos aminoácidos, como constituintes da proteína, já é bem compreendida. As proteínas têm papéis importantes nas plantas, envolvidas em

uma multiplicidade de processos celulares (HASAN; EL-MEHDAWY; SAAD, 2014; HILDEBRANDT et al., 2015). As enzimas são proteínas que catalisam muitas reações biológicas e são vitais para o metabolismo das plantas (HASAN; EL-MEHDAWY; SAAD, 2014). Além da síntese de proteínas, os aminoácidos estão envolvidos em uma variedade de processos de metabolismo primário e secundário nas plantas e atuam direta ou indiretamente em vários aspectos do crescimento e desenvolvimento da planta (OLIVEIRA et al., 2001). Devido às múltiplas funções que os aminoácidos desempenham nas plantas, presume-se que a regulação do catabolismo de aminoácidos envolve um amplo conjunto de reguladores gerais e específicos, e que haveria diferenças significativas entre espécies de plantas, locais de cultivo, tecidos e estágios de desenvolvimento (GALILI et al., 2014; HASAN; EL-MEHDAWY; SAAD, 2014; HÄUSLER; LUDEWIG; KRUEGER, 2014).

No presente trabalho, embora o conteúdo de aminoácidos tenha sido analisado apenas nos caules, com amostras coletadas em diferentes partes da planta, houve uma grande variação no perfil e na quantidade de aminoácidos detectados em cada um, reforçando a idéia de que cada tipo de caule apresenta funções distintas e muito específicas em *A. angustifolia*. Os aminoácidos envolvidos na biossíntese de outros aminoácidos e estoque de nitrogênio, bem como no metabolismo secundário, foram predominantes no tronco, ramo e grimpá. Uma grande quantidade de asparagina e ácido  $\gamma$ -aminobutírico + tirosina foram encontrados no tronco, enquanto o ramo apresentou altas quantidades de serina e glutamina. O conteúdo total de aminoácidos-livres foi muito semelhante entre o tronco e o ramo, enquanto que as grimpas apresentaram um menor teor total de aminoácidos-livres.

Em outra conífera, *Picea glauca*, a proporção e o conteúdo dos aminoácidos diferiram entre as partes da planta e a época do ano (DURZAN, 1967). Este autor demonstrou que gemas, ápices caulinares e folhas terminais dos ramos acumulavam altos níveis de nitrogênio solúvel na primavera, no final do verão e no início do inverno, sendo os principais componentes arginina, glutamina e prolina (DURZAN, 1967). Essas mudanças representam o armazenamento e mobilização de compostos de nitrogênio durante o início da dormência da planta ou o crescimento dos ramos. O teor de aminoácidos também variou entre as partes de plantas de *Rubus amabilis*, com uma maior quantidade de aminoácidos-livres encontrados no

caule em relação às folhas (CAIDAN et al., 2014). A maior parte da composição de aminoácidos desta espécie era composta de metionina, cisteína e GABA, com altos níveis de arginina no caule (CAIDAN et al., 2014).

Quando assimilado por plantas na forma de glutamato e glutamina, o nitrogênio é facilmente assimilado no metabolismo da planta (LEA et al., 2006). Estes aminoácidos funcionam como fonte de nitrogênio para a biossíntese de outros aminoácidos, ácidos nucleicos e outros compostos nitrogenados. Alternativamente, eles podem ser incorporados nos aminoácidos aspartato e asparagina (LEA et al., 2006).

O ácido glutâmico e a glutamina são considerados os principais precursores dos outros aminoácidos (CORUZZI; LAST, 2000) e, portanto, sua acumulação no caule de *A. angustifolia* pode estar relacionada à sua utilização como fonte de nitrogênio para a síntese de outros aminoácidos durante o crescimento das plantas, como nas plantas do presente trabalho, que estavam em pleno crescimento vegetativo. Além de estar envolvido na translocação de nitrogênio, o aspartato é um precursor da síntese de asparagina, treonina, metionina, lisina e isoleucina (LAM et al., 1995). Em *Picea glauca* foram encontradas alterações sazonais dramáticas na composição de nitrogênio solúvel das gemas apicais do tronco e folhas, relacionadas às mudanças morfogenéticas da planta. Quando o caule dessa espécie cessa o alongamento, o aminoácido arginina atua como fonte de reserva de nitrogênio (DURZAN, 1967).

A inter-conversão cíclica entre arginina, glutamina e asparagina desempenha um papel central no metabolismo do nitrogênio das coníferas e sua regulação é fundamental para manter a economia de nitrogênio ao longo do ciclo de vida das espécies (CÁNOVAS et al., 2007). No caule de *Piceae glauca*, os principais componentes do nitrogênio solúvel foram arginina, glutamina e prolina. Outros aminoácidos foram prontamente detectados, mas muitos destes contribuíram com uma pequena fração do total quantificado. Alanina e ácido  $\gamma$ -aminobutírico, entre outros compostos não identificados, estavam presentes em pequenas quantidades (DURZAN, 1967).

A asparagina acumula-se na maioria dos órgãos das plantas durante períodos de baixa síntese protéica e redução do suprimento de nitrogênio (CÁNOVAS et al., 2007). Em *A. angustifolia*, há uma redução na atividade

metabólica durante o outono e o inverno, possivelmente devido a menores temperaturas e níveis de radiação, o que conseqüentemente resulta em uma diminuição da taxa de crescimento do caule (ASSUMPÇÃO NETO, 2008; PEREIRA et al., 2016). Os resultados obtidos no presente estudo verificam que, quando a planta está com pouca atividade metabólica, a asparagina se acumula preferencialmente no tronco, em detrimento dos galhos e dos ramos, e que essa asparagina desempenha um papel crucial no metabolismo do nitrogênio durante o crescimento vegetativo de *A. angustifolia*.

O maior teor de asparagina no tronco é devido ao comportamento morfogênico do caule desta espécie, que exhibe crescimento longitudinal finito (60 a 70 anos) e crescimento radial ilimitado (ZANETTE et al., 2017), enquanto os ramos apresentam crescimento radial e tempo de vida limitados. Por outro lado, as grimpas apresentam crescimento longitudinal e radial limitado, além de uma vida curta (5-7 anos) (ZANETTE et al., 2017).

A acumulação rápida de ácido  $\gamma$ -aminobutírico em tecidos em resposta a estresse biótico e abiótico é importante no alongamento celular. Além disso, entre outras funções, o GABA desempenha um papel importante na determinação da identidade das células nas folhas e meristema apical (HÄUSLER; LUDEWIG; KRUEGER, 2014). Este aminoácido tem um papel central na regulação do pH e no armazenamento de nitrogênio, sendo um intermediário para a síntese de aminoácidos protéicos (RODRIGUEZ; FRIAS; VIDAL-VALVERDE, 2008). O conteúdo de GABA está intimamente relacionado com as concentrações de Ca/citosólico e Ca/calmodulina, que atuam como sinais celulares para vários processos fisiológicos, e o cálcio atua indiretamente na síntese de GABA a partir do glutamato (HÄUSLER; LUDEWIG; KRUEGER, 2014). Existem indícios de que existem receptores de GABA na membrana celular, o que confirma o importante papel do GABA como sinalizador (KINNERSLEY; LIN, 2000). Derivados do GABA também parecem estar envolvidos em processos de sinalização.

A acumulação de um produto derivado da transaminase de GABA levou a um atraso grave no crescimento de *Arabidopsis* (FAIT et al., 2008). Vale ressaltar que em nosso trabalho, o conteúdo do GABA foi avaliado em conjunto com a tirosina. Uma vez que as plantas estudadas de *A. angustifolia* estavam em condições homogêneas e bem fornecidas, é improvável que o GABA tenha

acumulado em maiores concentrações devido ao estresse, mas pode ter havido maior acumulação de tirosina. Em *Picea glauca*, o GABA também foi detectado no caule em pequenas quantidades (DURZAN, 1967). A tirosina está intimamente relacionada com a biossíntese de lignina porque fornece esqueletos de carbono para esta via metabólica (CÁNOVAS et al., 2007).

O triptofano, juntamente com fenilalanina e tirosina, compreendem os aminoácidos aromáticos que, além de constituintes de proteínas, são precursores de uma variedade de compostos secundários em plantas, alguns com funções de sinalização (HÄUSLER; LUDEWIG; KRUEGER, 2014). O triptofano é o precursor da síntese de AIA, a auxina mais abundante nas plantas (MANO; NEMOTO, 2012). Maiores quantidades deste aminoácido se acumulam durante o inverno, possivelmente para uso durante o crescimento da planta na primavera (KIM; GLERUM, 1995). Esta auxina está diretamente relacionada a vários tipos de tropismos presentes nas plantas (KIM; GLERUM, 1995). Quando os ramos ortotrópicos são deslocados para uma posição horizontal, um acúmulo assimétrico de auxina ocorre como uma resposta característica do gravitropismo (MUDAY, 2001). A distribuição assimétrica da auxina resulta na expressão de certos genes e fatores de transcrição regulatórios (MOYLE et al., 2002). Estudos exploratórios apontam para a auxina como um dos principais reguladores do ortotropismo e do plagiotropismo (MUDAY, 2001; VEIERSKOV et al., 2007). Giberelinas e ácido abscísico também podem estar envolvidos (LAMOTE; PIKARD, 2004).

A fenilalanina é o aminoácido precursor da via fenilpropanóide, o que leva, entre outras influências, a um aumento significativo do teor de lignina em plantas lenhosas. „Phenylalanine“ („tyrosine“) „ammonia-lyase“ (PAL) catalisa a desaminação de fenilalanina e tirosina em ácidos cinâmico e p-cumarico, respectivamente. Este é um passo metabólico crucial que liga o metabolismo do nitrogênio primário através da via shikimato, com a alocação de carbono para a biossíntese de fenilpropanoides (CÁNOVAS et al., 2007).

A maior parte do fluxo metabólico através desta via leva à biossíntese da lignina, constituinte importante da madeira (GALLARDO et al., 2003). O conteúdo de fenilalanina foi constante em todos os três tipos de caule estudados, com um ligeiro aumento no conteúdo do tronco. Este resultado mostra que a lignificação em *A. angustifolia* começa quando as plantas ainda são bastante jovens. Coníferas, em

geral, usam grandes quantidades de carbono na biossíntese de fenilpropanoides para síntese de lignina (CÁNOVAS et al., 2007). Embora a molécula de lignina não contenha nitrogênio, o esqueleto de fenilpropano requerido para esta via metabólica é fornecido pela desaminação dos aminoácidos fenilalanina ou tirosina (VAN HEERDEN et al., 1996). Além disso, as células lignificadas consomem numerosos grupos metil, que são gerados através do metabolismo do carbono associado ao catabolismo da serina e da glicina.

No presente trabalho, os ramos - além de um alto teor de ácido glutâmico ( $24,61 \pm 8,74 \mu\text{g/g}$  de MF) e glutamina ( $14,99 \pm 4,54 \mu\text{g/g}$  de MF) - altos valores de serina ( $11,47 \pm 2,35 \mu\text{g/g}$  de MF) também foram encontrados (FIGURA 1.B). Isto pode indicar o envolvimento deste aminoácido, juntamente com fenilalanina e tirosina, na síntese de lignina em *A. angustifolia*. No entanto, parece que *A. angustifolia* prioriza a tirosina. Nas coníferas, a existência de vários mecanismos de reassimilação de nitrogênio por células lignificadas é crucial para manter o processo de síntese de lignina sem afetar a economia de nitrogênio pela planta (CÁNOVAS et al., 2007).

A baixa acumulação de aminoácidos-livres nas grimpas pode indicar que este caule possui uma função fisiológica distinta da dos ramos e do tronco, como maior atividade fotossintética. Em *Picea glauca*, a quantidade de aminoácidos encontrados nas folhas foi muito menor que a quantidade encontrada no caule e nas gemas (DURZAN, 1967). Isso coincide com nossos resultados e reforça a hipótese de que estes caules têm funções diferentes e que as grimpas podem funcionar como folhas em *A. angustifolia*.

O conteúdo de alguns aminoácidos, como glutamato, glutamina, glicina, serina e aspartato, está intimamente relacionado com as taxas e processos fotossintéticos nas folhas (NOCTOR et al., 2002). O aspartato e o glutamato, por exemplo, representam cerca de 25% do teor total de aminoácidos-livre nas grimpas. O crescimento determinado da grimpas e sua vida útil mais curta na planta, que se tornam senescentes como as folhas e caem da planta após 5-7 anos (OLIVEIRA, 2011, ZANETTE et al., 2017), também são indícios de que esse caule tem uma função diferente das ramos e do tronco.

Em estudos de propagação vegetativa, tanto de estaquia quanto de enxertia, com propágulos de ramos e grimpas de *A. angustifolia*, as plantas mantiveram o

crescimento plagiotrópico (OLIVEIRA, 2011; WENDLING, 2011). No caso específico de enxertia com propágulos da grimpá, mesmo quando realizado em plantas jovens, foi encontrada uma limitação ao crescimento e vida útil das plantas enxertadas, com senescência após o terceiro ano (OLIVEIRA, 2011).

## 5.5 CONCLUSÃO

O teor de aminoácidos do caule de *A. angustifolia* diferiu significativamente entre tronco, ramo e grimpá, o que mostra que o caule não forma um sistema único e que há diferenças bioquímicas entre estes tipos de caule que variam de acordo com suas funções. Maiores quantidades de aminoácidos relacionados ao processo de lignificação no tronco indicam que sua função está relacionada à presença de uma grande quantidade de madeira e sua principal função é no suporte da planta e na condução hidráulica. O baixo teor total de aminoácidos, bem como a prevalência de aminoácidos relacionados ao mecanismo fotossintético, indica que a função principal das grimpas está diretamente relacionada à fotossíntese. No entanto, estudos adicionais envolvendo outros componentes fisiológicos, bioquímicos e genéticos são necessários para elucidar o papel e os mecanismos regulatórios destes caules.

## REFERÊNCIAS

- ASSUMPÇÃO NETO, A. **Plastocrono e filocrono aparentes anual em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, no município de Colombo-PR.** 55 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal - Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008. Disponível em: <<https://goo.gl/qkNssC>> Acesso em: 22/03/2018.
- CAIDAN, R.; CAIRANG, L.; LIU, B.; SUO, Y. R. Amino acid, fatty acid, and mineral compositions of fruit, stem, leaf and root of *Rubus amabilis* from the Qinghai-Tibetan Plateau. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, n. 1, p. 26-31, 2014. doi: 10.1016/j.jfca.2013.09.009.
- CÁNOVAS, F. M.; AVILA, C.; CANTÓN, F. R.; TORRE, F. de la. Ammonium assimilation and amino acid metabolism in conifers. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 9, p. 2307-2318, 2007. doi: 10.1093/jxb/erm051.
- CARVALHO, A.; KRUG, C. A.; MENDES, J. E. T. O dimorfismo dos ramos em *Coffea arabica* L. **Bragantia**, v. 10, n. 6, p. 151-159, 1950. doi: 10.1590/S0006-87051950000600001.
- CONSTANTINO, V. **Nutrição de mudas e morfogênese da *Araucaria angustifolia*. (BERT.) O. Ktze. submetida à enxertia.** 133 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal - Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017. Disponível em: <<https://goo.gl/tRNf12>> Acesso em: 15/02/2018.
- CORUZZI, G.; LAST, R. Amino acids. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Eds.) **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p.358-410, 2000.
- DURZAN, D. J. Nitrogen metabolism of *Piceae glauca* I. Seasonal changes of free amino acids in buds, shoot apices, and leaves, and the metabolism of uniformly labeled <sup>14</sup>C-L-Arginine by buds during the onset of dormancy. **Canadian Journal of Botany**, v. 46, n. 7, p. 909-919, 1967. doi: 10.1139/b68-119.
- ELBL, P.; LIRA, B. S.; ANDRADE, S. C. S; JO, L.; SANTOS, A. L. W.; COUTINHO, L. L.; FLOH, E. I. S.; ROSSI, M. Comparative transcriptoma analysis of early somatic embryo formation and seed development in Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 120, p. 903-915, 2014. doi: 10.1007/s11240-014-0523-3.
- FAGARD, M; LAUNAY, A.; CLÉMENT, G.; COURTIAL, J.; DELLAGI, A.; KRAPP, A.; SOULIÉ, M. C.; MASCLAUX-DRAUBESSE, C. Nitrogen metabolism meets phytopathology. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 19, p. 5643-5656, 2014. doi: 10.1093/jxb/eru323.
- FAIT, A.; FROMM, H.; WALTER, D.; GALILI, G.; FERNIE, A. R. Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 1, p. 14-19, 2008. doi: 10.1016/j.tplants.2007.10.005.



FLORES-RENTERÍA, L.; MOLINA-FREANER, F.; WHIPPLE, A. V.; GEHRING, C. A.; DOMÍNGUEZ, C. A. Sexual stability in the nearly dioecious *Pinus johannis* (Pinaceae). **American Journal of Botany**, v. 100, n. 3, p. 602-612, 2013. doi: 10.3732/ajb.1200068.

GALILI, G; AVIN-WITTENBERG, T.; ANGELOVICI, R.; FERNIE, A. R. The role of photosynthesis and amino acid metabolism in the energy status during seed development. **Frontiers in Plant Science**, v. 5 (447), 2014. doi: 10.3389/fpls.2014.00447.

GALLARDO, F.; FU, J. M.; JING, Z. P.; KIRBY, E. G.; CAOVAS, F. M. Genetic modification of amino acid metabolism in woody plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 6-7, p. 587-594, 2003. doi: 10.1016/S0981-9428(03)00081-0.

HAINES, R. J.; FOSSARD, R. A. Propagation of hoop pine (*Araucaria cunninghamii* AIT.). **Acta Horticulturae**, v. 78, p. 297-30, 1977. doi: 10.17660/ActaHortic.1977.78.38.

HASAN, H. M. I.; EL-MEHDAWY, M. F.; SAAD, E. K. Amino acid contents of leaves and stems for three types of herbal plants at Al-Gabal Al-Akhder Region. **World Journal of Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 15-19, 2014. doi: 10.5829/idosi.wjc.2014.9.1.1113.

HÄUSLER, R. E.; LUDEWIG, F.; KRUEGER, S. Amino acids – a life between metabolism and signaling. **Plant Science**, v. 229, p. 225-237, 2014. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.09.011.

HILDEBRANDT, T. M.; NESI, A. N.; ARAÚJO, W. L.; BRAUN, H. P. Amino acid catabolism in plants. **Molecular Plant**, v. 8, n. 11, p. 1563–1579, 2015. doi: 10.1016/j.molp.2015.09.005.

IRITANI, C.; ZANETTI, F.; CISLINSKY, J. Aspectos anatômicos da cultura in vitro de *Araucaria angustifolia*. I. Organização e desenvolvimento dos meristemas axilares ortotrópicos de segmentos caulinares. **Acta Biológica Paranaense**, v. 21, n. 1,2,3,4, p. 57-76, 1992. doi: 10.5380/abpr.v21i0.741.

KAGEYAMA, P. Y.; FERREIRA, M. Propagação vegetativa por enxertia *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, v. 12, p. 95-102, 1975. Disponível em: <<https://goo.gl/BvWNtB>> Acesso em: 22/03/2018.

KIM, Y. T.; GLERUM, C. Seasonal free amino acids fluctuations in red pine and white spruce needles. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 25, n. 5, p. 697-703, 1995. doi: 10.1139/x95-077.

KINNERSLEY, A. M.; LIN, F. Receptor modifiers indicate that 4-aminobutyric acid (GABA) is a potential modulator of ion transport in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 1, p. 65-76, 2000. doi: 10.1023/A:1006305120202.

KRÜßEL, L.; JUNEMANN, J.; WIRTZ, M.; BIRKE, H.; THORNTON, J. D.; BROWNING, L. W.; POSCHET, G.; HELL, R.; BALK, J.; BRAUN, H. P.; HILDREBRANDT, T. M. The mitochondrial sulfur dioxygenase ETHYLMALONIC ENCEPHALOPATHY PROTEIN1 is required for amino acid catabolism during carbohydrate starvation and embryo development in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 165, n. 1, p. 92-104, 2014. doi: 10.1104/pp.114.239764.

LAM, H. M.; COSCHIGANO, K.; SCHULTZ, C.; MELO-OLIVEIRA, TJADEN, G.; OLIVEIRA, I.; NGAI, N.; HSIEH, M. H.; CORUZZI, G. Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amino acid biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, p. 887-898, 1995. doi: 10.1105/tpc.7.7.887.

LaMORTE, C. E.; PICKARD, B. G. Control of gravitropic orientation. II Dual receptor model for gravitropism. **Functional Plant Biology**, v. 31, n. 2, p. 109-120, 2004. doi: 10.1071/FP03089.

LEA, P. J., SODEK, L., PARRY, M. A. J.; SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G. Asparagine in plants. **Annals of applied biology**, v. 150, n. 1, p. 1-26, 2006. doi: 10.1111/j.1744-7348.2006.00104.x.

MANO, Y.; NEMOTO, K. The pathway of auxin biosynthesis in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 8, p. 2853-2872, 2012. doi: 10.1093/jxb/ers091.

McSTEEN, P.; LEYSER, O. Shoot branching. **Annual Review Plant Biology**, v. 56, p. 353-374, 2005. doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144122.

MOYLE, R. J.; SCHRADER, A.; STENBERG, O.; OLSSON, O.; SAXENA, S.; SANDBERG, G.; BHALERAO, R. P. Environmental and auxin regulation of wood formation involves members of the Aux/IAA gene family in hybrid Aspen. **Plant Journal**, v. 31, n. 6, p. 675-685, 2002. doi: 10.1046/j.1365-3113X.2002.01386.x.

MUDAY, G. K. Auxins and tropisms. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 20, n. 3, p. 226-243, 2001. doi: 10.1007/s003440010027.

NOCTOR, G.; NOVITSKAYA, L.; LEA, P. J.; FOYER, C. H. Co-ordination of leaf minor acid contents in crop species: significance and interpretation. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 370, p. 939-945, 2002. Disponível em: <<https://goo.gl/vyzai>> Acesso em: 22/03/2018.

OLIVEIRA, I. C.; BRENNER, E.; CHIU, J.; KOURANOV, A.; LAM, H. M.; SHIN, M. J.; CORUZZI, G. Metabolite and light regulation of metabolism in plants: lessons from the study of a single biochemical pathway. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v. 34, p. 567-575, 2001. doi: 10.1590/S0100-879X2001000500003.

OLIVEIRA, L. S. **Enxertia, microenxertia e descrição do tropismo em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntz**. 90 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal - Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010. Disponível em: <<https://goo.gl/ZzGrC8>> Acesso em: 22/03/2018.

OLIVEIRA, I. P.; OLIVEIRA, L. C.; MOURA, C. S. F. T. Cultura do café: histórico, classificação e fases de crescimento. **Revista Faculdade Montes Belos**, v. 5, n. 4, p. 17-32, 2010. Disponível em: <<https://goo.gl/CP28vJ>> Acesso em: 22/03/2018.

PEREIRA, G. P.; ZANETTE, F.; BIASI, L. A.; CARVALHO, R. I. N. Atividade respiratória de meristemas apicais de ramos plagiotrópicos de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 1, p. 203-211, 2016. doi: 10.5902/1980509211113.

RODRIGUEZ, C.; FRIAS, J., VIDAL-VALVERDE, C. Correlation between some nitrogens fractions, lysine, histidine, tyrosine and ornithine contents during the germination of peas, beans and lentils. **Food Chemistry**, v. 108, n. 1, p. 245-252, 2008. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.10.073.

STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; ANDRADE, J. B. R.; BALBUENA, T. S.; GUERRA, M. P., HANDRO, W.; FLOH, E. I. S.; SILVEIRA, V. S. *Araucaria angustifolia* biotechnology. **Functional Plant Science Biotechnology**, v. 2, p. 20-28, 2008. Disponível em : <<https://goo.gl/jZz6GA>> Acesso em: 22/03/2018.

VAN HEERDEN, P. S.; TOWERS, G. H.; LEWIS, N. G. Nitrogen metabolism in lignifying *Pinus taeda* cell cultures. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n.21, p. 12350-12355, 1996. doi: 10.1074/jbc.271.21.12350.

VEIERSKOV, B.; RASMUSSEN, H. N.; ERIKSEN, B.; HANSEN-MØLLER, J. Plagiotropism and auxin in *Abies nordmanniana*. **Tree Physiology**, v. 27, n. 1, p. 149-153, 2007. Disponível em: <<https://goo.gl/XY9QHx>> Acesso em: 22/03/2018.

WENDLING, I. **Enxertia e florescimento precoce em *Araucaria angustifolia***. Comunicado técnico 272, Colombo: Embrapa Florestas, 2011. 7 p. Disponível em: <<https://goo.gl/2qyb4K>> Acesso em: 22/03/2018.

WU, G.; MEININGER, C. J. Analysis of Citrulline, Arginine, and Methylarginines using High-Performance Liquid Chromatography. **Methods in Enzymology**, v. 440, p. 177-189, 2008. doi: 10.1016/S0076-6879(07)00810-5

ZANETTE, F.; DANNER, M. A.; CONSTANTINO, V.; WENDLING, I. Particularidades e biologia reprodutiva de *Araucaria angustifolia*. In: WENDLING, I.; ZANETTE, F. (eds) **Araucária: particularidades, propagação e manejo de plantios**. Embrapa, Brasília, p. 15-39, 2017.

ZANETTE, F.; OLIVEIRA, L. S.; BIASI, L. A. Grafting of *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze through de four seasons of the year. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 4, p. 1364-1370, 2011. doi: 10.1590/S0100-29452011000400040.

ZEIER, J. New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. **Plant Cell Environment**, v. 36, n. 12, p. 2085-2103, 2013. doi: 10.1111/pce.12122.

## CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com as condições de estudo e análises realizadas neste trabalho, algumas conclusões gerais podem ser feitas sobre os três capítulos apresentados em relação à anatomia, morfologia e composição fisiológica do tronco, ramo e grimpá de *A. angustifolia* com as funcionalidades de cada um destes caules.

Os ápices do tronco, ramo e grimpá apresentaram em sua anatomia uma organização semelhante de células e tecidos, com o MAC em formato de domo e células pluripotentes, sem diferenças marcantes entre os ápices dos três caules. A organização do meristema apical em túnica e corpo é semelhante ao observado em espécies de angiospermas, e isto sugere que dentre as coníferas, as araucariáceas sejam um grupo mais especializado, já que esta organização em túnica e corpo é encontrada em outras espécies da família Araucariaceae, porém não é comum em outras coníferas.

Em relação ao conteúdo hormonal apresentado pelos três ápices, foram identificados e quantificados GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, ABA, AIA e AS. AJ foi identificado, porém não pode ser quantificado e Z não estava presente nas amostras. Isto não quer dizer que *A. angustifolia* não tenha citocininas, mas sim que outras citocininas possam estar presentes. Foram observadas diferenças no conteúdo hormonal, elementar e de aminoácidos-livres entre os três tipos de caule. GA<sub>3</sub> manteve o mesmo comportamento para plantas de diferentes idades, e pode ter relação com o polimorfismo dos ramos e grimpas e GA<sub>4</sub> pode ter relação com o polimorfismo do tronco, por propiciar a este maior crescimento. No entanto, esta é uma conclusão inicial, e estudos em outras épocas do ano e também com plantas em diferentes idades devem ser realizados para que tenhamos uma conclusão mais precisa sobre a composição hormonal em *A. angustifolia* e sua relação com o polimorfismo dos caules.

ABA foi o hormônio presente em maior quantidade nos três ápices, possivelmente devido às alterações naturais de temperatura e fotoperíodo da região territorial de coleta do material, o que nos mostra que a planta apresenta mecanismos de repouso vegetativo no outono/inverno. Os níveis de auxina nos ápices no início do outono foram baixos, devido a um repouso vegetativo que a planta apresenta no outono/inverno, o que pode ser confirmado também pelo

elevadíssimo conteúdo de ABA presente. Contudo, durante este repouso vegetativo o aminoácido triptofano se acumula em *A. angustifolia*, possivelmente para ser utilizado pela planta como precursor para a síntese de auxina, quando a planta estiver retomando o seu crescimento, na primavera.

Já em relação ao plagiotropismo e ortotropismo de ramos enxertados não se encontrou nenhuma relação clara entre o conteúdo hormonal e o tropismo das plantas. Fica evidente que o polimorfismo dos ramos independe do plagiotropismo ou ortotropismo, devendo desta forma serem tratados como fenômenos biológicos distintos.

De acordo com as condições de estudo e análises realizadas conclui-se que a estrutura e organização dos tecidos que formam os três tipos de caule (tronco, ramo e grimpas) de *A. angustifolia* são semelhantes. A composição elementar do xilema secundário da *A. angustifolia* difere entre o tronco, ramo e grimpas, em relação ao percentual de silício, enxofre, cálcio, carbono e oxigênio, o que está relacionado à função que cada caule apresenta na planta. A composição elementar corrobora a função de suporte desempenhada pelo tronco, e as grimpas de fotossíntese, que ficou evidente também na análise de aminoácidos-livres.

O teor de aminoácidos do caule de *A. angustifolia* difere significativamente entre tronco, ramos e grimpas, o que mostra que o caule não forma um sistema único e que há diferenças bioquímicas entre estes três tipos, que variam de acordo com suas funções. Maiores quantidades de aminoácidos relacionados ao processo de lignificação no tronco indicam que sua função está relacionada à presença de uma grande quantidade de madeira e sua principal função é no suporte da planta e na condução hidráulica. O baixo teor total de aminoácidos, bem como a prevalência de aminoácidos relacionados ao mecanismo fotossintético, indica que a função principal das grimpas está diretamente relacionada à fotossíntese.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

*Araucaria angustifolia* apresenta características únicas e de difícil compreensão. Ressalta-se que este trabalho representa um ponto de partida e não um fim. Muitas ideias de novas pesquisas advieram deste. A proposta inicial era estudar a espécie sob diversos ângulos, com as mais variadas técnicas. Nem todas as propostas foram realizadas. Contudo, diversas „sementinhas“ foram espalhadas para diversos pesquisadores que sequer imaginavam que a espécie fosse tão peculiar e com várias lacunas sobre sua biologia a serem compreendidas.

Vários esforços estão sendo feitos nas mais diversas linhas de pesquisa em relação à compreensão da biologia da planta e também ao uso comercial de seus produtos madeiráveis e não-madeiráveis, e o conhecimento mais aprofundado sobre os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e genéticos podem auxiliar nestas pesquisas. Então, destaca-se algumas das idéias que surgiram durante o desenvolvimento do trabalho, relacionadas principalmente aos aspectos biológicos de *A. angustifolia*, mas que por diversas razões não puderam ser realizadas ou concluídas.

Estudos relacionados a características físico-químicas da madeira e de lignina, bem como análise micromorfométrica dos traqueoides dos três tipos de caule devem ser realizadas visando uma melhor caracterização e também a identificação de características que possam diferenciar os três caules, com caráter investigativo e de pesquisa básica, auxiliando futuros trabalhos de pesquisa aplicada.

Um estudo prévio sobre a metabolômica dos compostos majoritários por RMN (Ressonância Magnética Nuclear) foi realizado, e a princípio não detectou nenhuma diferença entre os compostos majoritários (açúcares, ácidos orgânicos, compostos fenólicos) presentes nos três caules. Contudo, num segundo momento identificou-se uma composição completamente distinta para a grimpá (as análises foram realizadas em épocas e estações do ano distintas). Apesar desta distinção, o trabalho não foi levado adiante devido a problemas no equipamento, que cessou o seu funcionamento durante as análises. Porém, deixa-se como sugestão uma pesquisa nesta área.

O conhecimento sobre a biomecânica destes caules, buscando relacionar a morfologia e o tropismo do tronco, ramo e grimpá, bem como a formação do lenho de reação aos aspectos físicos é também um ponto importante para uma compreensão mais aprofundada da arquitetura da espécie, sob uma nova perspectiva morfológica e da ocupação do espaço. Diante de diversas peculiaridades da espécie, a reclassificação de *A. angustifolia* como um intermediário entre árvores e palmeiras deve ser levantada entre os estudiosos da área.

E por último, mas de suma importância e talvez a mais significativa das sugestões deixadas, é a de que estudos relacionados à proteômica e expressão gênica nos diferentes caules devem ser realizados, já que o polimorfismo dos ramos pode ser regulado por fatores intrínsecos de cada caule, e que esta característica seja determinada muito previamente no desenvolvimento da *A. angustifolia*.

## REFERÊNCIAS

- ALDEN, T. Seasonal variations in the occurrence of indole-3-acetic-acid in buds of *Pinus silvestris*. **Physiologia Plantarum**, v. 25, n. 1, p. 54-57, 1971. doi: 10.1111/j.1399-3054.1971.tb01087.x.
- ALONI, R.; LANGHANS, M.; ALONI, E.; ULLRICH, C. I. Role of cytokinin in the regulation of root gravitropism. **Planta**, v. 220, n. 1, p. 177-182, 2004. doi: 10.1007/s00425-004-1381-8.
- ANSELMINI, J. I.; ZANETTE, F. Microenxertia e sua caracterização morfológica em *Araucaria angustifolia*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 967-973, 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000400010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS (ABRAF). **Anuário estatístico da ABRAF 2013 ano base 2012**. Brasília, DF, 2013. 146 p. Disponível em: <<https://goo.gl/1k4JnR>> Acesso em: 21/03/2018.
- ASSUMPÇÃO NETO, A. **Plastocrono e filocrono aparentes anual em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, no município de Colombo-PR**. 55 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal - Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008. Disponível em: <<https://goo.gl/qkNssC>> Acesso em: 22/03/2018.
- ATTA, R.; LAURENS, L.; BOUCHERON-DEBUISSON, E.; GUIVARCH, A.; CARNERO, E.; GIRAUDAT-PATOT, V.; RECH, P.; CHIRQUI, D. Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyls explants grown *in vitro*. **The Plant Journal**, v. 57, n. 4, p. 626-644, 2009. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03715.x.
- BARBOSA, J. Z.; CONSTANTINO, V.; ZANETTE, F.; MOTTA, A. C. V.; PRIOR, A. S. Soil fertility affects elemental distribution in needles of the conifer *Araucaria angustifolia*: a microanalytical study. **Cerne**, v. 2, n. 3, p. 257-266, 2017. doi: 10.1590/0104776020172302313.
- BARTHÉLÉMY, D.; CARAGLIO, Y. Plant architecture: a dynamic, multilevel and comprehensive approach to plant form, structure and ontogeny. **Annals of Botany**, v. 99, n. 3, p. 375-407, 2007. doi: 10.1093/aob/mcl260.
- BEVERIDGE, C. A.; MATHESIU, U.; ROSE, R. J.; GRESSHOFF, P. M. Common regulatory themes in meristem development and whole-plant homeostasis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, n. 1, p. 44-51, 2007. doi: 10.1016/j.pbi.2006.11.011.
- BÖGRE, L.; MAGYAR, Z.; LÓPEZ-JUEZ, E. New clues to organ size control in plants. **Genome Biology**, v. 9, n. 7, p. 1-7 (226), 2008. doi: 10.1186/gb-2008-9-7-226.



BRETT, C.; WALDRON, K. **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. 2 ed. London, UK: Chapman & Hall, 1996.

BURROWS, G.; BULLOCK, S. Leaf anatomy of Wollemi pine (*Wollemia nobilis*, Araucariaceae). **Australian Journal of Botany**, v. 47, n. 5, p. 795–806, 1999. doi: 10.1071/BT98019.

BURROWS, G. E.; MEAGHER, P. F.; HEADY, R. D. An anatomical assessment of branch abscission and branch-base hydraulic architecture in the endangered *Wollemia nobilis*. **Annals of Botany**, v. 99, n. 4, p. 609-623, 2007. doi: 10.1093/aob/mcm003.

CAIDAN, R.; CAIRANG, L.; LIU, B.; SUO, Y. R. Amino acid, fatty acid, and mineral compositions of fruit, stem, leaf and root of *Rubus amabilis* from the Qinghai-Tibetan Plateau. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, n. 1, p. 26-31, 2014. doi: 10.1016/j.jfca.2013.09.009.

CÁNOVAS, F. M.; AVILA, C.; CANTÓN, F. R.; TORRE, F. de la. Ammonium assimilation and amino acid metabolism in conifers. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 9, p. 2307-2318, 2007. doi: 10.1093/jxb/erm051.

CAO, F. Y.; YOSHIOKA, K.; DESVEAUX, D. The roles of ABA in plant-pathogen interaction. **Journal of Plant Resources**, v. 124, n. 4, p. 489-499, 2011. doi: 10.1007/s10265-011-0409-y.

CARLES, C. C.; FLETCHER, J. C. Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. **Trends in plant science**, v. 8, n. 8, p. 394-401, 2003. doi: 10.1016/S1360-1385(03)00164-X.

CARVALHO, A.; KRUG, C. A.; MENDES, J. E. T. O dimorfismo dos ramos em *Coffea arabica* L. **Bragantia**, v. 10, n. 6, p. 151–159, 1950. doi: 10.1590/S0006-87051950000600001.

CASELLA, G.; BERGER, R. L. **Statistical inference**. Boston: Duxbury Press, 2<sup>a</sup> ed., 660 p, 2002.

CLINE, M. G.; HARRINGTON, C. A. Apical dominance and apical control in multiple flushing of temperate woody species. **Canadian Journal of Forestry Research**, v. 37, p. 74-83, 2007. doi: 10.1139/X06-218.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Pinhão (semente)**. Conjuntura especial, set. 2014, 21 p. Disponível em: <<https://goo.gl/HkbacM>>. Acesso em: 16/05/2017.

CONN, S.; GILLIHAM, M. Comparative physiology of elemental distributions in plants. **Annals of Botany**, v. 105, n. 7, p. 1081-1102, 2010. doi: 10.1093/aob/mcq027.

CONSTANTINO, V. **Nutrição de mudas e morfogênese da *Araucaria angustifolia*. (BERT.) O. Ktze. submetida à enxertia**. 133 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal - Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017. Disponível em: <<https://goo.gl/tRNf12>> Acesso em: 15/02/2018.

CONSTANTINO, V.; ZANETTE, F. Produção de borbulhas ortotrópicas para enxertia de *Araucaria angustifolia*. **Acta Biologica Paranaense**, Curitiba, v. 44, n. 4-5, p. 49-55, 2015. doi: 10.5380/abpr.v44i1-4.47598.

COSTA, M. P. **Arquitetura e alometria de espécies arbóreas em uma floresta estacional subtropical**. 67 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014. Disponível em: <<https://goo.gl/A5YTkq>> Acesso em: 02/05/2018.

CORUZZI, G.; LAST, R. Amino acids. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Eds.) **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p.358-410, 2000.

DEUNER, C.; BORGES, C. T.; ALMEIDA, A. S.; MENEGHELLO, G. E.; TUNES, L. V. M. Ácido jasmônico como promotor de resistência em plantas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 275-281, 2015. Disponível em: 105<<https://goo.gl/eSeiki>> Acesso em: 12/01/2018.

DIAS, A. C. C.; MARCHESAN, R.; PIERONI, G. B.; ALMEIDA, V.C.; VIEIRA, R. S.; MORAES, C.B. Qualidade da Madeira para produção de lâminas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Floresta**, v. 47, n. 3, p. 333-341, 2017. doi: 10.5380/rf.v47i1.50732.

DINH, N.; VU, D. T.; MULLIGAN, D.; NGUYEN, A. V. Accumulation and distribution of zinc in the leaves and roots of the hyperaccumulator *Nocca caerulescens*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 110, p. 85-95, 2015. doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.10.001.

DINNENY, J. R.; BENFEY, P. N. Plant stem cell niches: standing the test of time. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 553-557, 2008. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.001.

DOBREV, P. I.; VANKOVA, R. Quantification of abscisic acid, cytokinin, and auxin content in salt-stressed plant tissues. **Methods Mol. Biology**, v. 913, p. 251-261, 2012. doi: 10.1007/978-1-61779-986-0\_17.

DURZAN, D. J. Nitrogen metabolism of *Picea glauca* I. Seasonal changes of free amino acids in buds, shoot apices, and leaves, and the metabolism of uniformly labeled <sup>14</sup>C-L-Arginine by buds during the onset of dormancy. **Canadian Journal of Botany**, v. 46, n. 7, p. 909-919, 1967. doi: 10.1139/b68-119.

ELBL, P.; LIRA, B. S.; ANDRADE, S. C. S.; JO, L.; SANTOS, A. L. W.; COUTINHO, L. L.; FLOH, E. I. S.; ROSSI, M. Comparative transcriptoma analysis of early somatic embryo formation and seed development in Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 120, p. 903-915, 2014. doi: 10.1007/s11240-014-0523-3.

ENSIKAT, H. J.; GEISLER, T.; WEIGEND, M. A first report of hydroxylated apatite as structural biomineral in Loasaceae - plants' teeth against herbivores. **Scientific Reports**, v. 19, n. 6, (26073), 2016. doi: 10.1038/srep26073.

EVERT, R. F.; EICHORN, S. E. **Raven Biology of Plants**. New York: W.H. Freeman and Company, 8 ed., 2013, 900 p.

FAGARD, M.; LAUNAY, A.; CLÉMENT, G.; COURTIAL, J.; DELLAGI, A.; KRAPP, A.; SOULIÉ, M. C.; MASCLAUX-DRAUBESSE, C. Nitrogen metabolism meets phytopathology. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 19, p. 5643-5656, 2014. doi: 10.1093/jxb/eru323.

FAIT, A.; FROMM, H.; WALTER, D.; GALILI, G.; FERNIE, A. R. Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 1, p. 14-19, 2008. doi: 10.1016/j.tplants.2007.10.005.

FERNÁNDEZ, H.; FRAGA, M. F.; BERNARD, P.; REVILLA, M. A. Quantification of GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub>, GA<sub>9</sub> and GA<sub>20</sub> in vegetative and male cone buds from juvenile and mature trees of *Pinus radiata*. **Plant Growth Regulation**, v. 40, n. 3, p. 185-188, 2003. doi: 10.1023/A:1025070707899.

FIGUEIREDO, D. D.; BATISTA, R. A.; ROSZAK, P. J.; KÖHLER, C. Auxin production couples endosperm development to fertilization. **Nature Plants**, v. 1, p. 15184. 2015. doi: 10.1038/nplants.2015.184.

FLORES-RENTERÍA, L.; MOLINA-FREANER, F.; WHIPPLE, A. V.; GEHRING, C. A.; DOMÍNGUEZ, C. A. Sexual stability in the nearly dioecious *Pinus johannis* (Pinaceae). **American Journal of Botany**, v. 100, n. 3, p. 602-612, 2013. doi: 10.3732/ajb.1200068.

FROMM, J. Wood formation of trees in relation to potassium and calcium nutrition. **Tree Physiology**, v. 30, n. 9, p. 1140-1147, 2010. doi: 10.1093/treephys/tpq024.

GARCIA, C.; COELHO, C. M. M.; MARASCHIN, M.; OLIVEIRA, L. M. Conservação da viabilidade e vigor de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze durante o armazenamento. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 4, p. 857-867, 2014. doi: 10.1590/1980-509820142404006.

GASPAR, R. G. B. **Enxertia de copa e predição de hábitos de crescimento em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze**. 80 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018. Disponível em: <<https://goo.gl/RH2oBk>> Acesso em: 16/05/2018.

GOVIL, C. M. **Gymnosperms extinct and extant**. Delhi: Krishna Prakashan Media Ltda, 1 ed., 332 p., 2007.

GALILI, G.; AVIN-WITTENBERG, T.; ANGELOVICI, R.; FERNIE, A. R. The role of photosynthesis and amino acid metabolism in the energy status during seed development. **Frontiers in Plant Science**, v. 5 (447), 2014. doi: 10.3389/fpls.2014.00447.

GALLARDO, F.; FU, J. M.; JING, Z. P.; KIRBY, E. G.; CAOVS, F. M. Genetic modification of amino acid metabolism in woody plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 6-7, p. 587-594, 2003. doi: 10.1016/S0981-9428(03)00081-0.

HACKBARTH, C.; SOFFIATTI, P.; ZANETTE, F.; FLOH, E. I. S.; MACEDO, A. F.; LAUREANO, H. A. Free amino acid content in trunk, branches and branchlets of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Journal of Forestry Research**, (online), 2017. doi: 10.1007/s11676-017-0581-6 .

HAINES, R. J.; FOSSARD, R. A. Propagation of hoop pine (*Araucaria cunninghamii* AIT.). **Acta Horticulturae**, v. 78, p. 297-30, 1977. doi: 10.17660/ActaHortic.1977.78.38.

HALLÉ, F. Arquitectura de los árboles. **Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica**, v. 45, n. 3-4, p. 405-418, 2010. Disponível em: <<https://goo.gl/RQhDJB>> Acesso em: 15/02/2018.

HALLÉ, F.; OLDEMAN, R. A. A.; TOMLINSON, P. B. **Tropical trees and forests. An architectural analysis**. Berlin: Springer Verlag, 1978. 444 p. doi: 10.1007/978-3-642-81190-6.

HASAN, H. M. I.; EL-MEHDAWY, M. F.; SAAD, E. K. Amino acid contents of leaves and stems for three types of herbal plants at Al-Gabal Al-Akhder Region. **World Journal of Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 15-19, 2014. doi: 10.5829/idosi.wjc.2014.9.1.1113.

HÄUSLER, R. E.; LUDEWIG, F.; KRUEGER, S. Amino acids – a life between metabolism and signaling. **Plant Science**, v. 229, p. 225-237, 2014. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.09.011.

HE, H.; VENEKLAAS, E. J.; KUO, J.; LAMBERS, H. Physiological and ecological significance of biomineralization in plants. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 3, p. 166-174, 2014. doi: 10.1016/j.tplants.2013.11.002.

HEISDRA, R.; SABATINI, S. Plant and animal stem cells: similar yet different. **Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 5, p. 301-312, 2014. doi: 10.1038/nrm3790.

HEISLER, M. G.; OHNO, C.; DAS, P.; SIEBER, G.; REDDY, G. V.; LONG, J. A.; MEYEROWITZ, E. M. Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. **Current Biology**, v. 15, n. 21, p. 1899-1911, 2005. doi: 10.1016/j.cub.2005.09.052.

HEPLER, P. K. Calcium: A Central Regulator of Plant Growth and Development. **The Plant Cell**, v. 17, p. 2142-21-55, 2005. doi: 10.1105/tpc.105.032508.

HILDEBRANDT, T. M.; NESI, A. N.; ARAÚJO, W. L.; BRAUN, H. P. Amino acid catabolism in plants. **Molecular Plant**, v. 8, n. 11, p. 1563–1579, 2015. doi: 10.1016/j.molp.2015.09.005.

HOLALU, S. V. **Phytochrome B controls shoot architecture by regulating phytochrome interacting factors and phytohormones**. 94 f. Thesys (Graduate and Professional Studies of Texas A&M University) Texas A&M University, Texas, 2014. Disponível em: <https://goo.gl/cn8XWY> Acesso em: 19/01/2018.

IRITANI, C. **Aspectos múltiplos da cultura ‘in vitro’ da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze**. 1997. 222 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997. Disponível em: <<https://goo.gl/5z6LNZ>> Acesso em: 16/03/2018.

IRITANI, C.; ZANETTI, F.; CISLINSKY, J. Aspectos anatômicos da cultura in vitro de *Araucaria angustifolia*. I. Organização e desenvolvimento dos meristemas axilares ortotrópicos de segmentos caulinares. **Acta Biológica Paranaense**, v. 21, n. 1,2,3,4, p. 57-76, 1992. doi: 10.5380/abpr.v21i0.741.

JIANG, K.; FELDMANN, L. J. Regulation of root apical meristem development. **Annual Review of Cell Developmental Biology**, v. 21, p. 485-509, 2005. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.122303.114753.

JO, L. **Estabelecimento de marcadores bioquímicos para embriogênese somática em *Araucaria angustifolia***. 2012. 117 f. (Dissertação). São Paulo, SP, Universidade de São Paulo, 2012, 117 p. Disponível em: <https://goo.gl/Chx8LS> Acesso em: 21/03/2018.

KAGEYAMA, P. Y.; FERREIRA, M. Propagação vegetativa por enxertia *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, v. 12, p. 95-102, 1975. Disponível em: <<https://goo.gl/BvWNtB>> Acesso em: 22/03/2018.

KIM, Y. T.; GLERUM, C. Seasonal free amino acids fluctuations in red pine and white spruce needles. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 25, n. 5, p. 697-703, 1995. doi: 10.1139/x95-077.

KINNERSLEY, A. M.; LIN, F. Receptor modifiers indicate that 4-aminobutyric acid (GABA) is a potential modulator of ion transport in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 1, p. 65-76, 2000. doi: 10.1023/A:1006305120202.

KOEHLER, A. B. **Modelagem biométrica e morfometria em povoamentos jovens de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze., em Tijucas do sul, Estado do Paraná**. 142 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009. Disponível em: <<https://goo.gl/EHmzKs>> Acesso em: 15/02/2018.

KONG, L.; ABRAMS, S.; OWEN, S. J.; GRAHAM, H.; ADERKAS, P. V. Phytohormones and their metabolites during long shoot development in Douglas-fir

following cone induction by Gibberellins injection. **Tree Physiology**, v. 28, p. 1357-1364, 2008. doi: 10.1093/treephys/28.9.1357.

KRÜßEL, L.; JUNEMANN, J.; WIRTZ, M.; BIRKE, H.; THORNTON, J. D.; BROWNING, L. W.; POSCHET, G.; HELL, R.; BALK, J.; BRAUN, H. P.; HILDREBRANDT, T. M. The mitochondrial sulfur dioxygenase ETHYLMALONIC ENCEPHALOPATHY PROTEIN1 is required for amino acid catabolism during carbohydrate starvation and embryo development in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 165, n. 1, p. 92-104, 2014. doi: 10.1104/pp.114.239764.

LAM, H. M.; COSCHIGANO, K.; SCHULTZ, C.; MELO-OLIVEIRA, T.; JADEN, G.; OLIVEIRA, I.; NGAI, N.; HSIEH, M. H.; CORUZZI, G. Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amino acid biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 7, p. 887-898, 1995. doi: 10.1105/tpc.7.7.887.

LaMORTE, C. E.; PICKARD, B. G. Control of gravitropic orientation. II Dual receptor model for gravitropism. **Functional Plant Biology**, v. 31, n. 2, p. 109-120, 2004. doi: 10.1071/FP03089.

LAUTNER, S.; EHLTING, B.; WINDEISEN, E.; RENNENBERG, H.; MATYSSEK, R.; FROMM, J. Calcium nutrition has a significant influence on wood formation of poplar. **New Phytology**, v. 173, n. 4, p. 743-752, 2007. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.01972.x.

LEA, P. J.; SODEK, L.; PARRY, M. A. J.; SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G. Asparagine in plants. **Annals of applied biology**, v. 150, n. 1, p. 1-26, 2006. doi: 10.1111/j.1744-7348.2006.00104.x.

LEYSER, H. M. O. The control of shoot branching: an example of plant information processing. **Plant Cell & Environment**, n. 32, p. 694-703, 2009. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.01930.x.

LONG, J.; BARTON, M. K. Initiation of axillary and floral meristems in *Arabidopsis*. **Developmental Biology**, n. 218, p. 341-353, 2000. doi: 10.1006/dbio.1999.9572.

LUDWIG-MÜLLER, J. Auxin conjugates: Their role for plant development and in the evolution of land plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 1757-1773. 2011.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Ceres, 2006, 638 p.

MANO, Y.; NEMOTO, K. The pathway of auxin biosynthesis in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 8, p. 2853-2872, 2012. doi: 10.1093/jxb/ers091.

MATTOS, P. P.; BORTOLI, C.; MARCHESAN, C.; ROSOT, N. C. **Caracterização Física, Química e Anatômica da Madeira de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze**. Embrapa Florestas: Comunicado Técnico 160, Colombo/PR, 2006. Disponível em: <<https://goo.gl/WrU1WL>> Acesso em: 09/02/2018.

MENEGALE, M. L. C.; CASTRO, G. S. A.; MANCUSO, M. A. C. Silício: interação com o sistema solo-planta. **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v. 4, n. especial, p. 435-454, 2015. Disponível em: <<https://goo.gl/XDSxn2>> Acesso em: 22/03/2018.

McSTEEN, P.; LEYSER, O. Shoot branching. **Annual Review Plant Biology**, v. 56, p. 353-374, 2005. doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144122.

MORIKAWA, C. K.; SAIGUSA, M. Mineral compositions and accumulation of silicon in tissues of blueberry (*Vaccinium corymbosus* cv. Bluecrop) cuttings. **Plant and Soil**, v. 258, n. 1, p. 1-8, 2004. doi: 10.1023/B:PLSO.0000016489.69114.55.

MOYLE, R. J.; SCHRADER, A.; STENBERG, O.; OLSSON, O.; SAXENA, S.; SANDBERG, G.; BHALERAO, R. P. Environmental and auxin regulation of wood formation involves members of the Aux/IAA gene family in hybrid Aspen. **Plant Journal**, v. 31, n. 6, p. 675-685, 2002. doi: 10.1046/j.1365-3113X.2002.01386.x.

MUDAY, G. K. Auxins and tropisms. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 20, n. 3, p. 226-243, 2001. doi: 10.1007/s003440010027.  
MATTOS, J. R. **O pinheiro Brasileiro**. Florianópolis, SC: Editora UFSC, 2011, 698 p.

MÜLLER, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Rapid and sensitive hormonal profiling of complex plant samples by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Plant Methods**, v. 7, n. 37, p. 1-11, 2011. doi: 10.1186/1746-4811-7-37.

NETER, J.; KUTNER, M.; NACHTSHEIM; WASSERMAN, W. Applied Linear Statistical Models. Nova Iorque: **McGraw-Hill/Irwin Companies**, 4<sup>a</sup> ed., 1408 p., 1996.

NOCTOR, G.; NOVITSKAYA, L.; LEA, P. J.; FOYER, C. H. Co-ordination of leaf minor acid contents in crop species: significance and interpretation. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 370, p. 939-945, 2002. Disponível em: <<https://goo.gl/vyzai>> Acesso em: 22/03/2018.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964. doi: 10.1007/BF01248568.

OLIVEIRA, I. C.; BRENNER, E.; CHIU, J.; KOURANOV, A.; LAM, H. M.; SHIN, M. J.; CORUZZI, G. Metabolite and light regulation of metabolism in plants: lessons from the study of a single biochemical pathway. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v. 34, p. 567-575, 2001. doi: 10.1590/S0100-879X2001000500003.

OLIVEIRA, L. S. **Enxertia, microenxertia e descrição do tropismo em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntz**. 90 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal - Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010. Disponível em: <<https://goo.gl/ZzGrC8>> Acesso em: 22/03/2018.

OLIVEIRA, I. P.; OLIVEIRA, L. C.; MOURA, C. S. F. T. Cultura do café: histórico, classificação e fases de crescimento. **Revista Faculdade Montes Belos**, v. 5, n. 4, p. 17-32, 2010. Disponível em: <<https://goo.gl/CP28vJ>> Acesso em: 22/03/2018.

PANZA, V.; LÁINEZ, V.; MARODER, H.; PREGO, I.; MALDONADO, S. Storage reserves and water in mature seeds of *Araucaria angustifolia*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 140, n. 2, p. 273-281, 2002. doi: 10.1046/j.1095-8339.2002.00093.x.

PEREIRA, G. P.; ZANETTE, F.; BIASI, L. A.; CARVALHO, R. I. N. Atividade respiratória de meristemas apicais de ramos plagiotrópicos de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 1, p. 203-211, 2016. doi: 10.5902/198050921113.

PRACIAK, A.; PASIECZNIK, N.; SHEIL, D.; VAN HEIST, M.; SASSEN, M.; CORREIA, C. S.; DIXON, C.; FYSON, G.; RUSHFORD, K.; TEELING, C. (eds). **The CABI encyclopedia of forest trees**. Oxfordshire: CABI, 2013, 531 p.

PSOTA, V.; KLICOVÁ, S.; KRALÍK, J. Changes in the content of indole-3-acetic in the needles of dwarf pine in the course of the year. **Biologia Plantarum**, v. 37, n. 3, p. 453-455, 1995. doi: 10.1007/BF02913998.

R CORE TEAM. R: **A language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing. Viena, Áustria, 2016.

RASMUSSEN, H. N.; VEIERSKOV, B.; MOLLER, J. H.; NORBÆK, R. „Lateral control”: phytohormone relations in the conifer treetop and the short- and long-term effects of bud excision in *Abies nordmanniana*. **Journal Plant Growth Regulation**, v. 29, n. 3, p. 268-279, 2010. doi: 10.1007/s00344-009-9132-5.

REINHARDT, D.; PESCE, E. R.; STIEGER, P.; MANDEL, T.; BALTENSPERGER, K.; BENNET, M.; TRAAS, J.; FRIML, J.; KUHLEMEIER, C. Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. **Nature**, v. 426, n. 6964, p. 255-260. doi: 10.1038/nature02081.

REIS, M. S.; LADIO, A.; PERONI, N. Landscapes with *Araucaria* in South America: evidence for a cultural dimension. **Ecology and Society**, v. 19, n. 2, artigo 43, 2014. doi: 10.5751/ES-06163-190243.

REITZ, R.; KLEIN, R. M. Araucariáceas. In R. REITZ (Ed.), **Flora ilustrada Catarinense**. Itajaí, SC: Herbário Barbosa Rodrigues, 1966, 62 p.

RODRIGUES, M. A.; KERBAUY, G. B. Meristemas: fontes de juventude e plasticidade no desenvolvimento vegetal. **Hoehnea**, v. 36, n. 4, p. 525-550, 2009. doi: 10.1590/S2236-89062009000400001.

RODRIGUEZ, C.; FRIAS, J., VIDAL-VALVERDE, C. Correlation between some nitrogens fractions, lysine, histidine, tyrosine and ornithine contents during the germination of peas, beans and lentils. **Food Chemistry**, v. 108, n. 1, p. 245-252, 2008. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.10.073.



ROGGE-RENNER, G. D.; STEINER, N.; SCHMIDT, E. C. et al. Structural and component characterization of meristem cells in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze zygotic embryo. **Protoplasma**, v. 250, n. 3, p. 731-739, 2013. doi: 10.1007/s00709-012-0457-8.

SCOFIELD, S.; MURRAY, J. A. H. The evolving concept of the meristem. **Plant Molecular Biology**, v. 60, n. 6, p. V-VII, 2006. doi: 10.1007/s11103-006-0061-4.

SHANI, E.; YANAI, O.; ORI, N. The role of hormones in shoot apical meristems. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 5, p. 484-489, 2006. doi: 10.1016/j.pbi.2006.07.008.

SHIBATA, M.; COELHO, C. M. M.; ARALDI, C. G.; ADAN, N.; PERONI, N. Physiological and physical quality of local *Araucaria angustifolia* seed variety. **Acta scientiarum**, Maringá, v. 38, n. 2, p. 249-256, 2016. doi: 10.4025/actasciagron.v38i2.27976.

SIEGLOCH, A. M.; MARCHIORI, J. N. C. Anatomia da madeira de treze espécies de coníferas. **Ciência da Madeira**, v. 6, n. 3, p. 149-165, 2015. doi: 10.12953/2177-6830/rcm.v6n3p149-165.

SILVA, R. J. F.; AGUIAR-DIAS, A. C. A.; MENDONÇA, M. S. Rosetas e concrecências cristalinas silicificadas em *Piper* (Piperaceae): registros inéditos de macropadrões. **Acta Amazonica**, v. 44, n. 4, p. 435-446, 2014. doi: 10.1590/1809-4392201305553.

SOUZA, M. I. F.; SALGUEIRO, F.; CARNAVALE-BOTTINO, M.; FÉLIX, D. B.; ALVES-FERREIRA, M.; BITTENCOURT, J. V. M.; MARGIS, R. Patterns of genetic diversity in southern and southeastern *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze relict populations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 3, p. 546-556, 2009. doi: 10.1590/S1415-47572009005000052.

STAHL, Y.; SIMON, R. Plant stem cells niches. **International Journal of Developmental Biology**, v. 49, n. 5/6, p. 479-489, 2005. doi: 10.1387/ijdb.041929ys.

STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; ANDRADE, J. B. R.; BALBUENA, T. S.; GUERRA, M. P.; HANDRO, W.; FLOH, E. I. S.; SILVEIRA, V. *Araucaria angustifolia* biotechnology. **Functional Plant Science Biotechnology**, v. 2, p. 20-28, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 4. ed. 2009, 848 p.

TANAKA, K.; HAYASHI, K.; NATSUME, M.; KAMIYA, Y.; SAKAKIBARA, H.; KAWAIDE, H.; KASHARA, H. UGT74D1 catalyzes the glucosylation of 2-oxindole-3-acetic acid in the auxin metabolic pathway in *Arabidopsis*. **Plant & cell physiology**, v. 55, n. 1, p. 218-228, 2014.

TEICHMANN, T.; MUHR, M. Shaping plant architecture. **Frontiers in Plant Science**, v. 6 (233), p. 1-18, 2015. doi: 10.3389/fpls.2015.00233.

THOMAS, P. *Araucaria angustifolia*. **The IUCN Red List of Threatened Species** **2013**: e.T32975A2829141. doi: 10.2305/IUCN.UK.2013-RLTS.T32975A2829141.en.

TORRES, J. E. L.; SERPA, P. R. K.; MESQUITA, A. R. S.; COELHO, I. A. M.; ALMEIDA, C. C. S.; BEZERRA NETO, E. Análise comparativa do teor de silício em diferentes órgãos vegetais do bambu. In: **IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão**, UFRPE, Recife, 2009. Disponível em: <<http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R1429-2.pdf>>. Acesso em: 06/06/2017.

TUCKER, M. R.; LAUX, T. Connecting the paths in plant stem cell regulation. **Trends in Cell Biology**, v. 17, n. 8, p. 403-410, 2007. doi: 10.1016/j.tcb.2007.06.002.

VAN HEERDEN, P. S.; TOWERS, G. H.; LEWIS, N. G. Nitrogen metabolism in lignifying *Pinus taeda* cell cultures. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n.21, p. 12350-12355, 1996. doi: 10.1074/jbc.271.21.12350.

VEIERSKOV, B.; RASMUSSEN, H. N.; ERIKSEN, B.; HANSEN-MØLLER, J. Plagiotropism and auxin in *Abies nordmanniana*. **Tree Physiology**, v. 27, n. 1, p. 149-153, 2007. Disponível em: <<https://goo.gl/XY9QHx>> Acesso em: 22/03/2018.

VERDEIL, J. L.; ALEMANNO, L.; NIEMENAK, N.; TRANBARGER, T. J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 6, p. 245–252, 2007. doi:10.1016/j.tplants.2007.04.002.

VERNOUX, T.; BENFEY, P. N. Signals that regulate stem cell activity during plant development. **Current opinion in Genetics & Development**, v. 15, n. 4, p. 388-394, 2005. doi: 10.1016/j.gde.2005.06.008.

VITTI, G. C.; LIMA, E.; CICARONE, F. Cálcio, magnésio e enxofre. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006.

WANG, Y.; LI, J. Molecular basis of plant architecture. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 253-279, 2008. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092902.

WANG, Q.; LITTLE, C. H. A.; SHENG, C.; ODÉN, P. C.; PHARIS, R. P. Effect of exogenous 113Gibberellins A<sub>4</sub>/7 on tracheid production, longitudinal growth and the levels of indole-3-acetic acid and gibberellins A<sub>4</sub>, A<sub>7</sub> and A<sub>9</sub> in the terminal shoot of *Pinus sylvestris* seedlings. **Physiologia Plantarum**, v. 86, n. 2, p. 202–208, 1992. doi: 10.1034/j.1399-3054.1992.860203.x.

WEHR, N. J.; TOMAZELLO-FILHO, M. Caracterização dos anéis de crescimento de árvores de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, através de microdensitometria de raios-X. **Scientia Florestalis**, n. 58, p. 161-170, 2000.

WENDLING, I. **Enxertia e florescimento precoce em *Araucaria angustifolia***. Comunicado técnico 272, Colombo: Embrapa Florestas, 2011. 7 p. Disponível em: <<https://goo.gl/2qyb4K>> Acesso em: 22/03/2018.

WENDLING, I. **Tecnologia de enxertia de *Araucaria angustifolia* para produção precoce de pinhões, com plantas de porte reduzido**. Colombo: Embrapa Florestas, Comunicado técnico 351, maio, 2015. Disponível em: <<https://goo.gl/v6B5JW>> Acesso em: 01/02/2018.

WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. Resgate vegetativo e estaquia de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze. **Revista Floresta**, v. 39, n. 1, p. 93-104, 2015. doi: 10.1590/0100-67622015000100009.

WENDLING, I.; STUEPP, C. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. *Araucaria angustifolia* grafting: techniques, environments and origin of propagation material. **Bosque**, v. 37, n. 2, p. 285-293, 2016. doi: 10.4067/S0717-92002016000200007.

WESTERMARK, U. Calcium promoted phenolic coupling by superoxide radical – a possible lignifications reaction in wood. **Wood Science Technology**, v. 16, n. 1, p. 71-78, 1982. doi: 10.1007/BF00351376.

WILSON, B. F. Apical control of branch growth and angle in woody plants. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 5, p. 601-607, 2000. doi: 10.2307/2656846.

WIMMER, R.; LUCAS, B. N. Comparing mechanical properties of secondary wall and cell corner middle lamella in spruce wood. **Iawa Journal**, v. 18, n. 1, p. 77–78, 1997. doi: 10.1163/22941932-90001463.

WIMMER, R.; LUCAS, B. N.; TSUI, T. I.; OLIVER, W. C. Longitudinal hardness and Young's modulus of spruce tracheid secondary walls using indentation technique. **Wood Science Technology**, v. 31, n. 2, p. 131-141, 1997. doi: 10.1007/BF00705928.

WU, G.; MEININGER, C. J. Analysis of Citrulline, Arginine, and Methylarginines using High-Performance Liquid Chromatography. **Methods in Enzymology**, v. 440, p. 177-189, 2008. doi: 10.1016/S0076-6879(07)00810-5.

YEUNG, E. C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Kluwer Academic, Netherlands, p. 205-247, 1995.

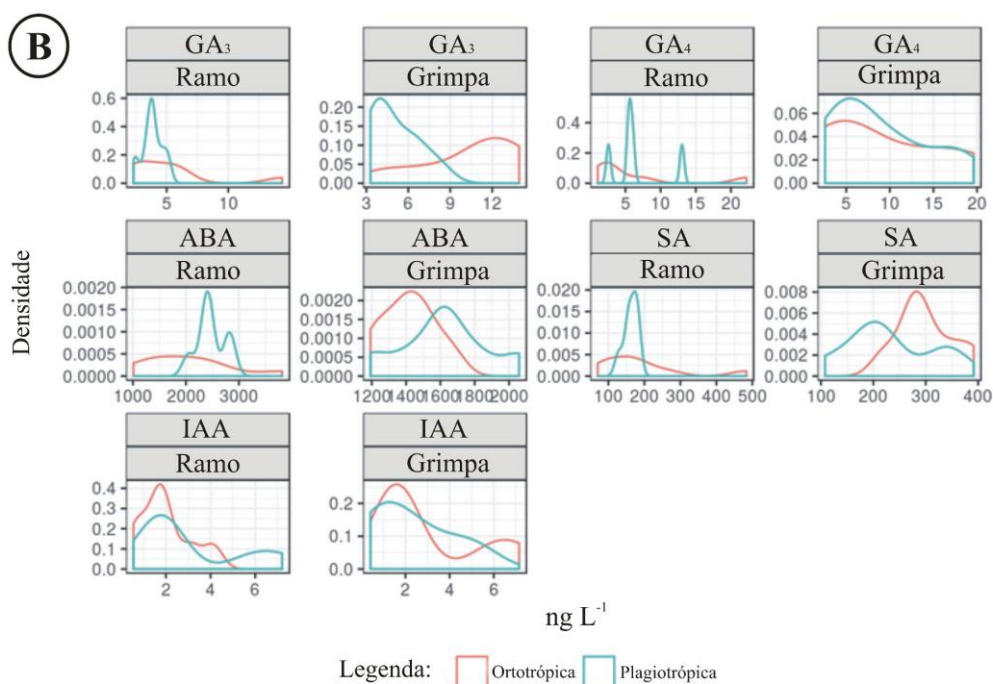
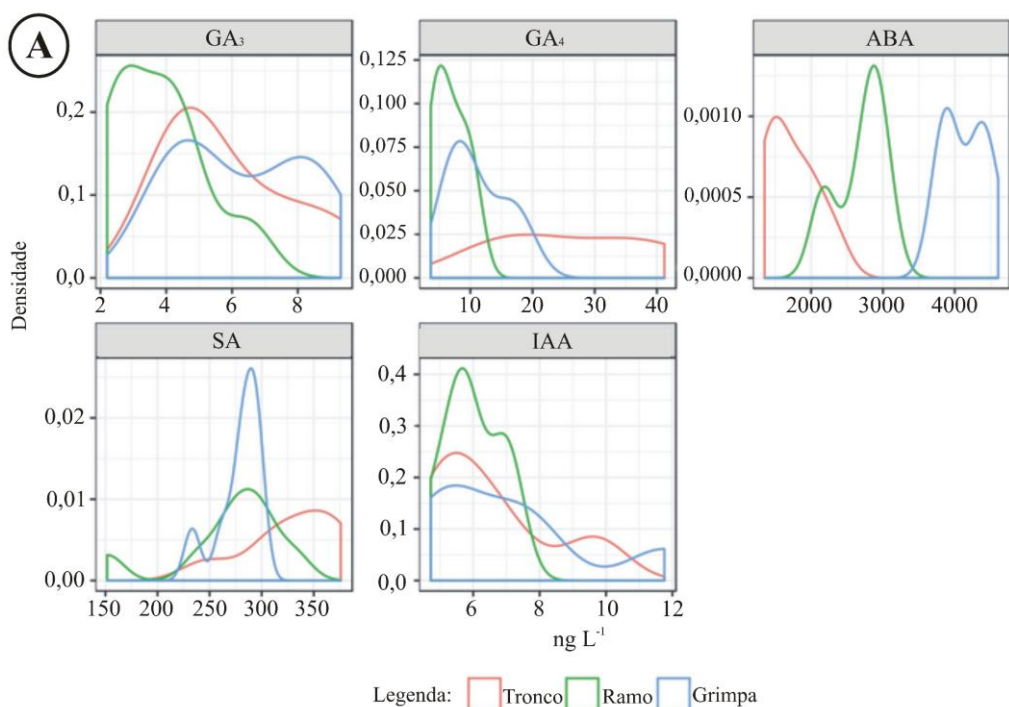
ZANETTE, F.; DANNER, M. A.; CONSTANTINO, V.; WENDLING, I. Particularidades e biologia reprodutiva de *Araucaria angustifolia*. In: WENDLING, I.; ZANETTE, F. (eds) **Araucária: particularidades, propagação e manejo de plantios**. Embrapa, Brasília, p.15–39, 2017.

ZANETTE, F.; OLIVEIRA, L. S.; BIASI, L. A. Grafting of *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze through de four seasons of the year. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 4, p. 1364–1370, 2011. doi: 10.1590/S0100-29452011000400040.

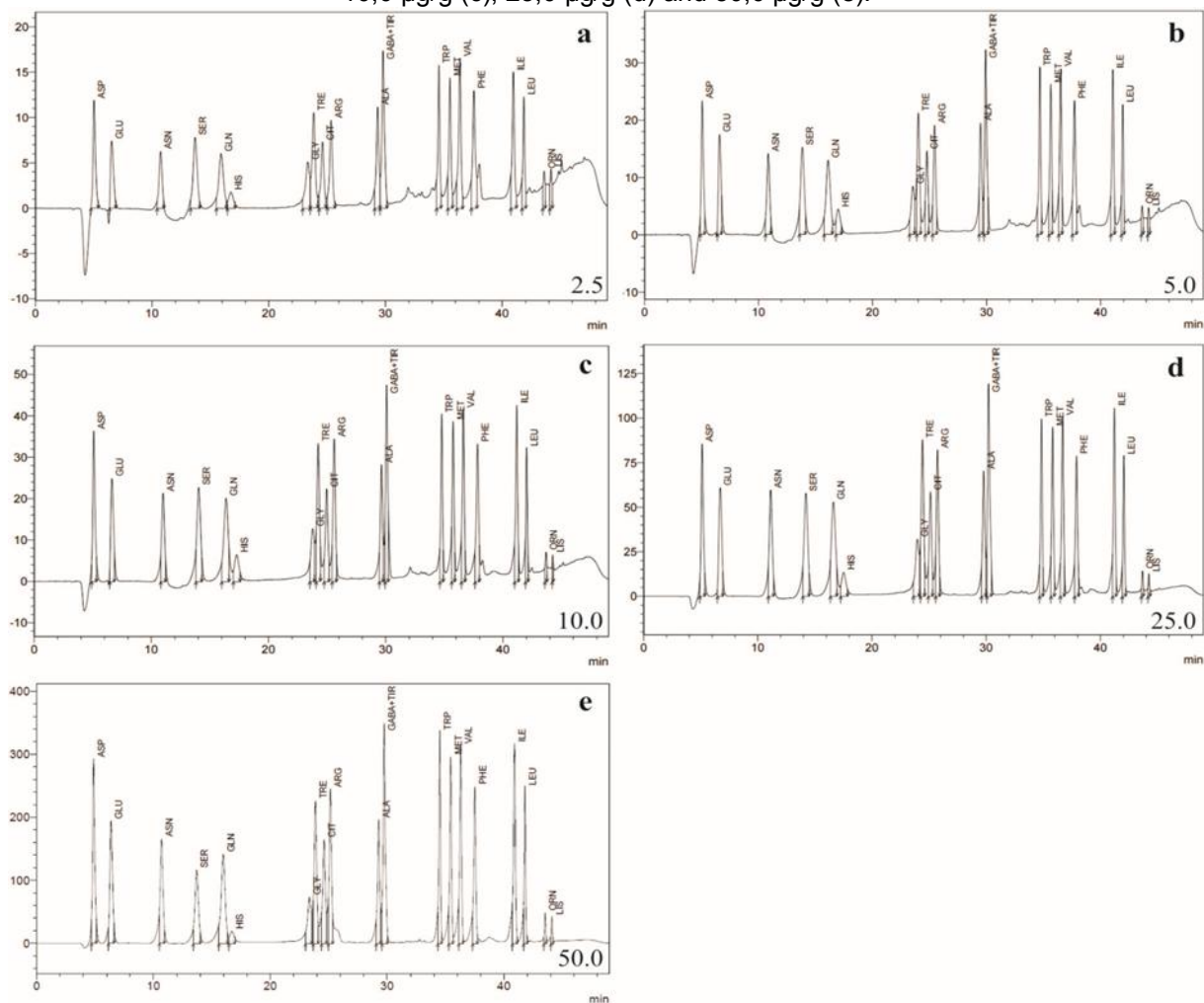
ZEIER, J. New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. **Plant Cell Environment**, v. 36, n. 12, p. 2085-2103, 2013. doi: 10.1111/pce.12122.

## APÊNDICES

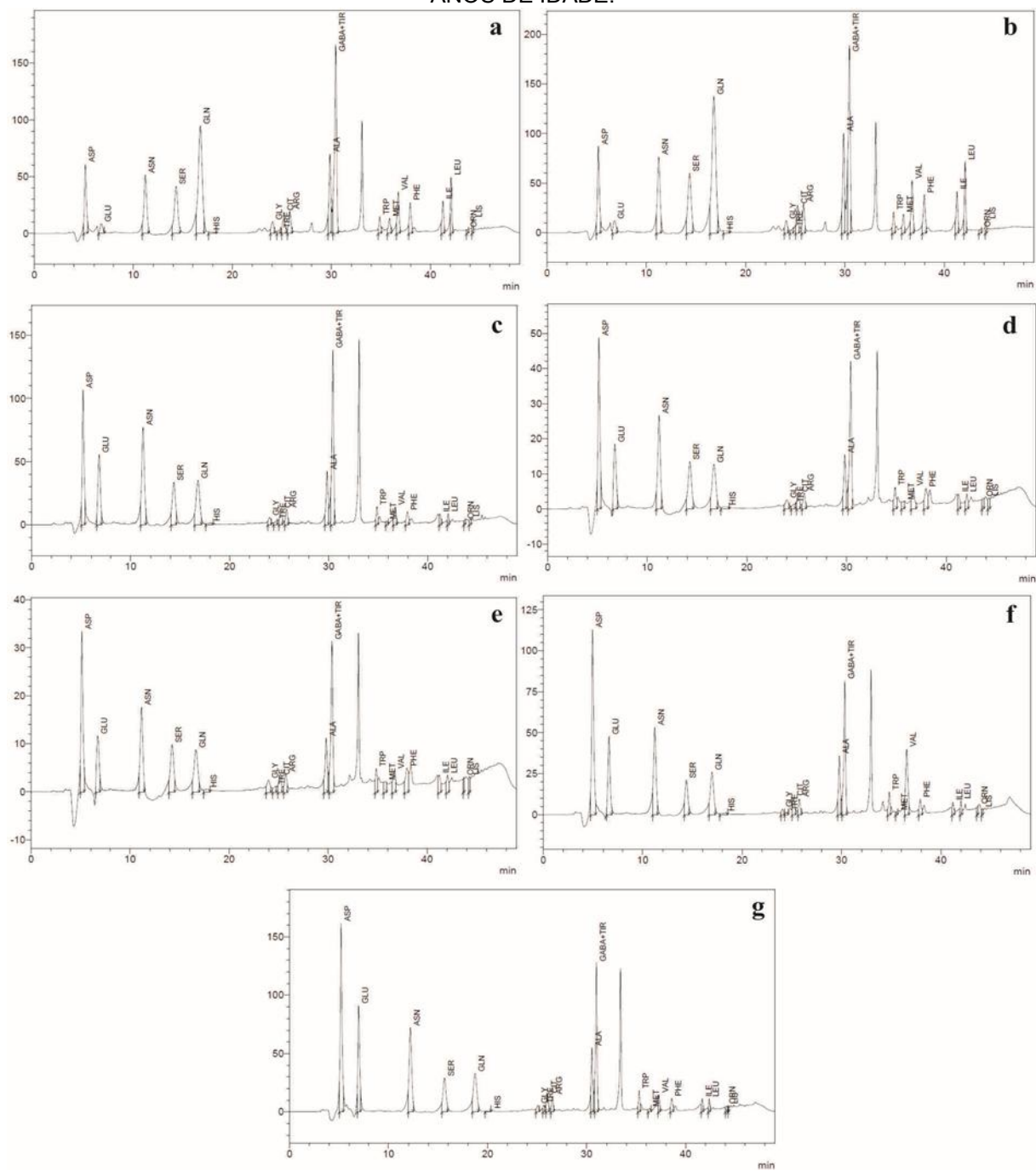
APÊNDICE 01. CURVAS DE DENSIDADE DE KERNEL PARA GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, ABA, AS E AIA DOS ÁPICES DO TRONCO, RAMO E GRIMPA DE *A. ANGUSTIFOLIA* DO EXPERIMENTO 01(A) E EXPERIMENTO 2 (B). CURVAS PRÓXIMAS UMAS DAS OUTRAS INDICAM QUE OS VALORES FORAM SIMILARES. O FORMATO DA CURVA PARA A MAIORIA DOS FITORMÔNIOS/ÁPICES CAULINARES APRESENTA CAUDA MAIS LONGA, OU SEJA, INDICA UMA DISTRIBUIÇÃO ASSIMÉTRICA DOS DADOS.



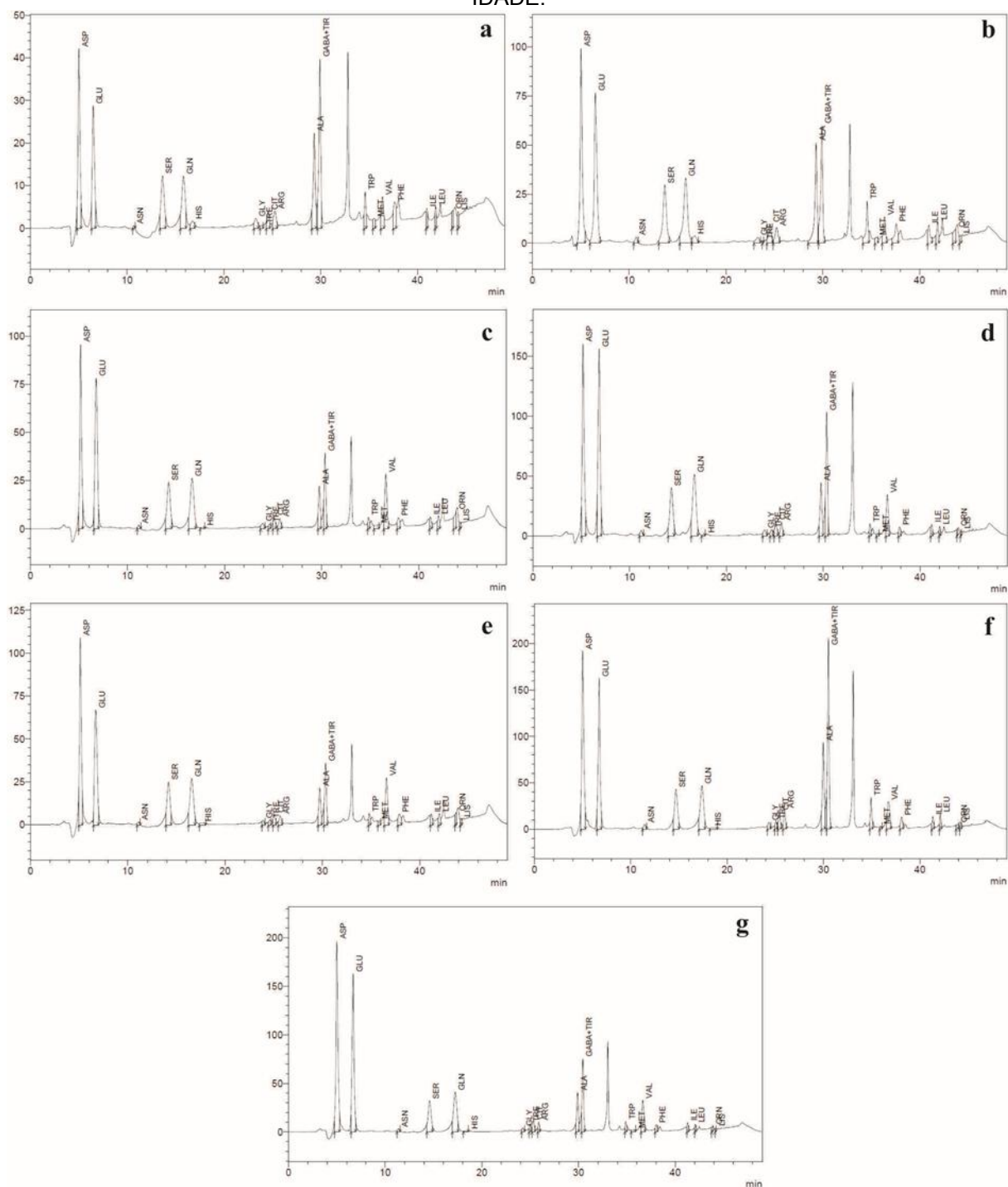
APÊNDICE 02. CROMATOGRAMAS DAS CURVAS-PADRÃO UTILIZADAS PARA O CÁLCULO DOS AMINOÁCIDOS-LIVRES, COM 5 DIFERENTES CONCENTRAÇÕES: 2,5  $\mu\text{g/g}$  (a), 5,0  $\mu\text{g/g}$  (b), 10,0  $\mu\text{g/g}$  (c), 25,0  $\mu\text{g/g}$  (d) and 50,0  $\mu\text{g/g}$  (e).



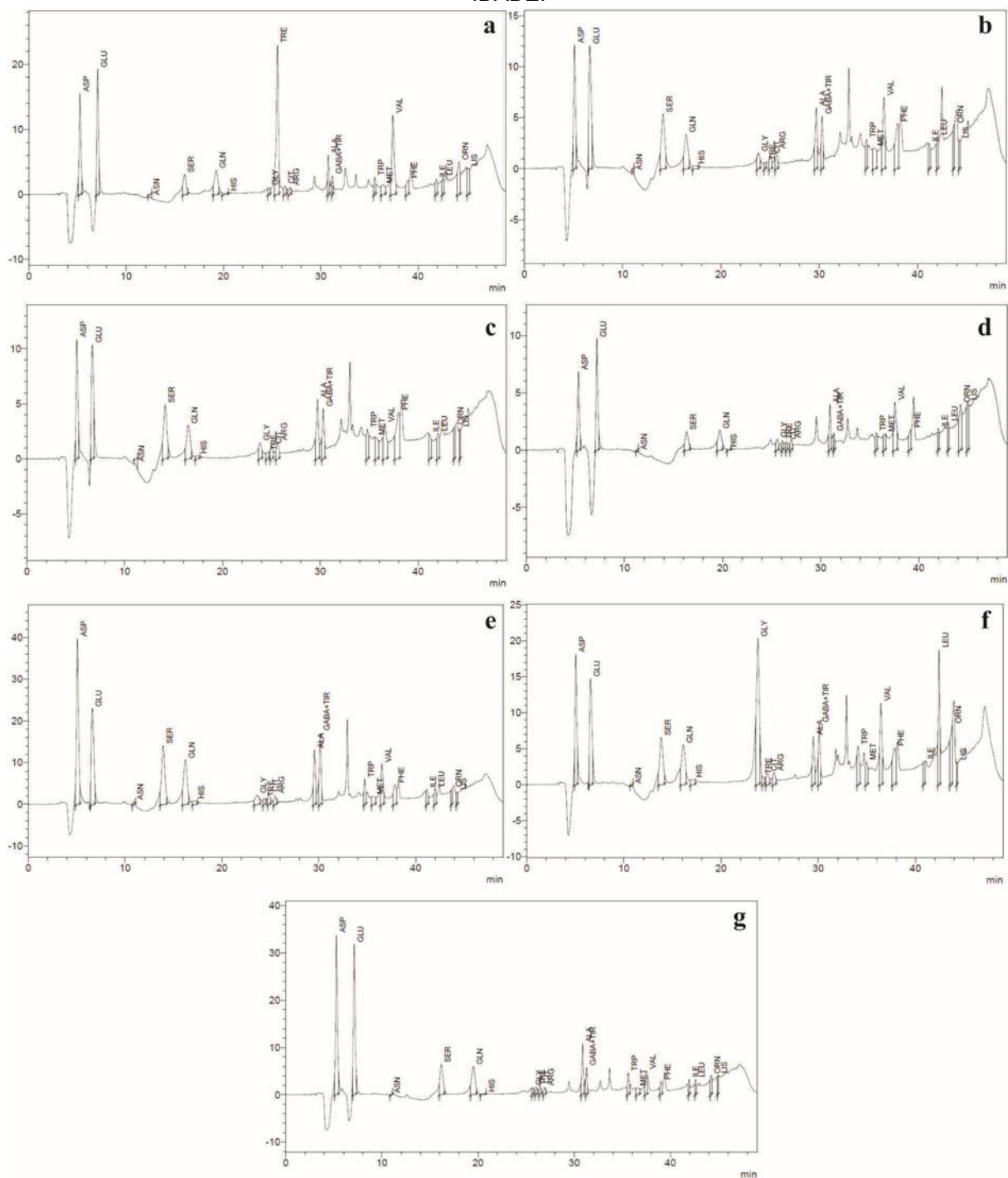
APÊNDICE 03. CROMATOGRAFAS DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS-LIVRES DAS AMOSTRAS DO TRONCO (a-g) OBTIDAS DE SETE INDIVÍDUOS DE *A. angustifolia* COM DOIS ANOS DE IDADE.



APÊNDICE 04. CROMATOGRAMAS DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS-LIVRES DAS AMOSTRAS DE RAMO OBTIDAS DE SETE INDIVÍDUOS DE *A. angustifolia* COM DOIS ANOS DE IDADE.



APÊNDICE 05. CROMATOGRAMAS DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS-LIVRES DAS AMOSTRAS DE GRIMPA OBTIDAS DE SETE INDIVÍDUOS DE *A. angustifolia* COM DOIS ANOS DE IDADE.





APÊNDICE 06. ESPELHO DO ARTIGO PUBLICADO (CAPÍTULO 3) NO PERIÓDICO JOURNAL OF FORESTRY RESEARCH, EM DEZEMBRO DE 2017.

J. For. Res.  
<https://doi.org/10.1007/s11676-017-0581-6>



ORIGINAL PAPER

## Free amino acid content in trunk, branches and branchlets of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae)

Crizane Hackbarth<sup>1</sup> · Patrícia Soffiati<sup>2</sup> · Flávio Zanette<sup>1</sup> · Eny Iochet Segal Floh<sup>3</sup> · Amanda Ferreira Macedo<sup>3</sup> · Henrique Aparecido Laureano<sup>4</sup>

Received: 25 April 2017 / Accepted: 25 September 2017  
 © Northeast Forestry University and Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2017

**Abstract** *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze exhibits dimorphism in its stem structure, where the trunk is orthotropic and branches and branchlets (primary and secondary branches) are plagiotropic. These stems exhibit different behavior when used for vegetative propagation, and only segments of trunk can form a complete plant. The physiological and biochemical mechanisms that characterize these stems are still little known. The aim of this study was to describe the free amino acid profiles in trunks, branches, and branchlets of *A. angustifolia*. Segments of 5 cm in length were excised from young individuals below the stem apex. The needles were removed and samples

were frozen and lyophilized. The determinations were made by high-performance liquid chromatography, and the results were expressed as µg/g fresh weight (FW). The trunks and branches had the highest content of total amino acids, which were  $112.23 \pm 20.57$  µg/g FW and  $111.97 \pm 27.78$  µg/g FW, respectively. The amino acids—glutamine, aspartate and γ-aminobutyric acid and tyrosine—were noticeably higher in the three types of stems. In the trunk, a higher amount of asparagine and tryptophan, was also detected. Glutamic acid and glutamine were found in higher quantities in the branches. The branchlets had very low total amino acid content ( $30.79 \pm 4.19$  µg/g FW), wherein asparagine is the only amino acid not detected. Thus, it was observed that the profile of the free amino acid differs among trunks, branches, and branchlets in *A. angustifolia*, indicating that they perform different functions.

**Project funding:** This work was financially supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

The online version is available at <http://www.springerlink.com>

Corresponding editor: Tao Xu.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11676-017-0581-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

**Keywords** Brazilian pine · Physiological mechanisms · Stem's dimorphism · Free amino acids